



Université de Montréal

Impact de HOXB4 sur les cellules B

Par  
Renée-Maude Matte-Garneau

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté de médecine  
En vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences  
En sciences biomédicales

Septembre 2009

© Renée-Maude Matte-Garneau 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :  
Impact de HOXB4 sur les cellules B

Présentée par :  
Renée-Maude Matte-Garneau

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Éric Millot  
Président-rapporteur

Dr Denis Claude Roy  
Directeur de recherche

Dr Michel Duval  
Membre du Jury

## **Résumé**

La greffe de cellules souches hématopoïétiques autologue est une thérapie de plus en plus utilisée. Cependant, les traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie intensifs peuvent affecter les cellules souches et diminuer le nombre de ces cellules pouvant être mobilisées à des fins de transplantation. Il serait donc très utile de pouvoir expandre ces cellules souches afin de s'assurer qu'elles soient en quantité suffisante pour procéder à la greffe. Or, il a été démontré que la protéine HOXB4 a la capacité d'expandre les cellules souches hématopoïétiques humaines et murines. Lors d'une greffe autologue, la moelle osseuse est cependant colonisée par des cellules malignes. Notre objectif était donc de s'assurer que la protéine HOXB4 expand les cellules souches hématopoïétiques normales mais n'expand pas les cellules « souches » leucémiques. De plus, comme des expériences précédentes ont démontré que chez des souris transplantées avec des cellules souches surexprimant HOXB4, la reconstitution du système hématopoïétique pouvait favoriser les cellules myéloïdes aux dépens des cellules lymphoïdes, nous avons aussi voulu déterminer l'impact de HOXB4 sur la différenciation des cellules progénitrices lymphoïdes normales. Pour ce faire, nous avons exposé des cellules humaines et murines à la protéine HOXB4 afin de comparer la prolifération des cellules B malignes à celle des cellules B normales. De plus, nous avons évalué l'impact de HOXB4 sur les cellules B à leurs différents stades de différenciation. Nos résultats démontrent que HOXB4 ne favorise pas l'expansion des cellules leucémiques. De plus, nous avons observé que les cellules lymphoïdes surexprimant la protéine HOXB4 ont un ralentissement dans leur processus de différenciation. Aussi, la surexpression de HOXB4 entraîne une diminution de la fréquence et du nombre de progéniteurs lymphoïdes normaux. Ces résultats démontrent donc que la protéine HOXB4 ne produit pas d'expansion des cellules malignes. De plus, elle confère un désavantage prolifératif aux cellules lymphoïdes.

Mots-clés : CSH, expansion, cellules lymphoïdes B, CLP, HOXB4, cellules leucémiques

**Abstract**

Transplantation of autologous hematopoietic stem cell is increasingly used. However, intensive chemotherapy or radiation therapy protocols can affect stem cells and decrease the number of these cells that can be mobilized for stem cell transplantation. There is therefore a need to create protocols for the expansion of these stem cells to increase their numbers sufficiently to proceed to transplantation. It has been demonstrated that the protein HOXB4 has the ability to expand human and murine hematopoietic stem cells. In the context of autologous transplantation, the bone marrow is often colonized by malignant cells. Our objective was to ensure that the protein HOXB4 expands normal hematopoietic stem cells but not leukemia "stem" cells. In addition, since previous experiments have shown that in mice transplanted with stem cells overexpressing HOXB4, hematopoietic reconstitution could favour myeloid cells over lymphoid cells, we determined the impact of HOXB4 on the differentiation of normal lymphoid progenitor cells. Toward this goal, we have exposed human and mouse leukemia cells to HOXB4 and compared the proliferation of malignant versus normal B cells. In addition, we have evaluated the impact of HOXB4 on the different stages of B cell differentiation. Our results show that HOXB4 does not favour leukemia cell expansion. In addition, we observed that lymphoid cells overexpressing HOXB4 are slowed in their differentiation process. Also, HOXB4 overexpression decreases the frequency and number of normal lymphoid progenitors. These results demonstrate that HOXB4 protein does not lead to malignant stem cell expansion. In addition, the HOXB4 protein confers a proliferative disadvantage to lymphoid cells.

Key words: HSC, expansion, B cells, CLP, HOXB4, leukemic cells

## **Table des matières**

Introduction.....	1
1. Hématopoïèse.....	2
1.1 Les cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	3
1.2 La niche hématopoïétique.....	4
1.2.1 Le homing.....	6
1.2.2 Le contrôle de l'auto-renouvellement dans la niche.....	6
1.3 Facteurs de croissance.....	7
1.4 Différenciation et engagement dans une lignée.....	8
1.5 Les CMP.....	9
1.6 Les CLP.....	10
1.6.1 Les cellules B.....	10
1.6.1.1 Différenciation en lymphocytes B.....	11
Figure 1.6.1.1 Différenciation des lymphocytes B.....	13
1.6.1.2 Facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules B.....	13
1.6.1.3 Cytokines et récepteurs de cytokines impliqués dans le développement B.....	15
2. Désordre hématopoïétique.....	16
2.1 Leucémie lymphoblastique aigüe et chronique.....	16
2.2. Le lymphome non hodgkinien.....	17
2.3 Leucémie myéloïde aigüe.....	17
3. Greffe de cellules souches hématopoïétiques.....	18
3.1 Sources de cellules souches hématopoïétiques.....	19
3.2 Limites de la greffe de cellules souches hématopoïétiques.....	20
4. Les facteurs de transcription de la famille HOX.....	21
4.1 Régulation des gènes HOX.....	22
4.2 Les cofacteurs de HOX.....	22
4.3 Les gènes HOX dans l'hématopoïèse.....	23
4.4 HOXB4 et auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques.....	24
Description et pertinence du projet.....	27
5.1 Problématique.....	28
5.2 Hypothèses.....	29
5.3 Objectifs de travail.....	29
Matériels et méthodes.....	30
6.1 Culture des cellules leucémiques humaines avec TAT-HOXB4.....	31
6.1.1 PCR Multiplex.....	32
6.1.2 PCR semi-quantitative.....	32
6.1.3 Essai semi-solide.....	33
6.2 Infection rétrovirale.....	33
6.3 Modèle murin de leucémie B.....	34
6.3.1 Essai de dilution limite.....	35
6.3.2 Détection des cellules leucémiques.....	35
6.3.3 Infection des cellules E2A-PBX1.....	35

6.4 Etude de la différenciation des lymphocytes B.....	36
6.4.1 Étude de l'ontogénie B.....	36
6.4.2 Étude de la fréquence des progéniteurs B.....	37
6.5 Études des CLP.....	38
6.6 Études statistiques.....	38
Résultats.....	40
7.1 Expansion des cellules leucémiques humaines « in vitro » avec le TAT-HOXB4.....	41
7.2 Expansion des cellules E2A-PBX1 « in vivo » surexprimant la protéine HOXB4.....	45
7.3 Effet de la surexpression de la protéine HOXB4 sur les lymphocytes B normaux.....	48
7.4 Évaluation de la fréquence des progéniteurs B qui se différencient en cellules B.....	51
7.5 Études des CLP.....	52
Figures.....	55
Figure 1 : Effet de HOXB4 sur les cellules B et T normales et la population B leucémique d'une LLC.....	56
Figure 2: Effet de HOXB4 sur la population T normale et la population lymphomateuse B d'une LNH.....	58
Figure 3 : Effet de HOXB4 sur la population B lymphomateuse.....	61
Figure 4 : Effet de HOXB4 sur une population myéloïde d'une LMA.....	63
Figure 5 Effet de la protéine HOXB4 sur des cellules leucémiques E2A-PBX1 murines.....	65
Figure 6 : Effet de HOXB4 sur la reconstitution des lignées dans les organes périphériques et le sang (greffe de 10 000 cellules).....	67
Figure 7 : Effet de HOXB4 sur la reconstitution des différentes lignées cellulaires dans les organes périphériques et le sang (greffe de 50 000 cellules).....	72
Tableau 8 : Effet de HOXB4 sur la fréquence des progéniteurs B.....	76
Figure 9 : Stratégie de tri pour les CLP.....	78
Figure 10 : Effet de HOXB4 sur les CLP.....	80
Discussion.....	82
9.1 Effet de la protéine HOXB4 sur les cellules leucémiques humaines et murines.....	83
9.2 Effet de la protéine HOXB4 sur la différenciation et la fréquence des progéniteurs B.....	87
9.3 Effet de HOXB4 sur les CLP.....	93
Conclusions et perspectives.....	95
Bibliographie.....	99
Annexe.....	125
Annexe 1 Constructions utilisées.....	126
Annexe 2 Schémas des différentes expériences.....	127

## **Abréviations**

APC : Allophycoérythrine

BSA : « Bovine Serum Albumin », Albumine de sérum bovin

CLP: « Common Lymphoid Progenitor », progéniteur commun des lympoïdes

CMP: « Common Myeloid Progenitor », progéniteur commun des myéloïdes

CSH: Cellule Souche Hématopoïétique

CXCR4: « C-X-C Motif receptor 4 », récepteur ayant un motif C-X-C

DMEM: « Dulbecco's Modified Eagle Medium »

EBF: « Early B cell Factor », facteur précoce des cellules B

FcγR-II/III: Récepteur II-III pour le fragment Fcγ des immunoglobulines

FITC: Fluoresceine

FLT3: « FMS-like Tyrosine Kinase-3 », tyrosine kinase-3 « FMS-like »

G-CSF: « Granulocyte Colony Stimulating Factor », facteur de stimulation des colonies granulocytaire

GFP: « Green Fluorescent Protein », protéine fluorescente verte

GVHD: « Graft Versus Host Disease », maladie du greffon contre l'hôte

HBSS: « Hank's Balanced Salt Solution » solution saline balancée de Hank's

HLA: « Human Leucocyte Antigen », antigène leucocytaire humain

IgH: Immunoglobuline « heavy chain », chaîne lourde de l'immunoglobuline

IgM: Immunoglobuline M

IL-7: Interleukine 7

IL-7R : Récepteur de l'interleukine-7

IMDM: « Iscove's Modified Dulbecco Medium »



Lin: « Lineage »

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LNH : Lymphome Non-Hodgkinien

LMA: Leucémie myéloïde aiguë

MBR: « Major Breakpoint Region », region de cassure majeure

MCR: « Minor Cluster Region », région de cassure mineure

MEIS: « Myeloid ecotropic viral integration site », site d'intégration virale  
myéloïde

MPP: « Multipotent progenitor », progéniteur multipotent

NK: « Natural Killer »

PCR: « Polymerase chain reaction », réaction en chaîne de la polymérase

PE: Phycoérythrine

PECy5: Phycoérythrine Cyanine-5

PECy7: Phycoérythrine Cyanine-7

RAG1/2: « Recombinant Activation Gene 1-2 », gène d'activation de la  
recombinaison 1-2

RPM: Rotations Par Minute

SCF: « Stem Cell Factor », facteur des cellules souches

SDF1: « Stromal-Derived Factor-1 », facteur-1 dérivé du stroma

TALE: « Three Amino acid Loop Extension », boucle d'extension de 3 acides  
aminés

## **Remerciements**

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr. Denis Claude Roy pour l'accueil reçu dans son laboratoire alors que je débutais mon stage pour la dernière session de mon baccalauréat. J'ai pu ensuite continuer à la maîtrise sous sa supervision. Merci également à Dr Gorazd Krosl et Dr Janette Bijl pour leur soutien et les judicieux conseils apportés tout au long de mon travail dans le laboratoire. Un merci tout particulier à Marie-Pier Giard et Stéphanie Beauchemin pour leur patience et tout le savoir-faire qu'elles m'ont transmis. Je vous dois une bonne partie de ce mémoire!!! Sans oublier tous les membres du laboratoire, qui nous écoutent, nous conseillent, nous aident et surtout nous appuient. Merci énormément les filles.

En dehors des heures de laboratoire, j'ai également reçu beaucoup d'encouragements de la part de ma famille. Merci à mes parents et ma petite sœur pour tout leur soutien, quel qu'il soit... Merci à toute la famille d'être restée aussi positive à mon égard, surtout dans les moments les plus difficiles. Une pensée particulière à mamie Paulo. Merci d'avoir pris aussi bien soin de moi pendant la première année et les derniers mois de ma maîtrise.

Finalement, les dernières et non les moindres, je tiens à remercier mes copines. Josée, Julie et Véronic, merci pour vos oreilles lors de mes petits moments de découragements, merci de votre soutien et simplement merci d'être présentes!

# **Introduction**

## **1.Hématopoïèse**

L'hématopoïèse est le processus par lequel les cellules souches hématopoïétiques (CSH) donnent naissance à toutes les cellules sanguines. On compte dans le sang plusieurs types de cellules ayant chacun une fonction particulière et nécessaire comme le transport de l'oxygène et la défense face aux pathogènes. Il s'agit d'un processus continu permettant le maintien entre la production et la perte des cellules sanguines.<sup>1</sup> En plus de réagir aux pertes de sang et aux infections, le système hématopoïétique renouvelle, au cours d'une seule journée,  $2.4 \times 10^8$  globules rouges et  $4.6 \times 10^6$  globules blancs.<sup>2;3</sup> De l'embryogénèse jusqu'à la vie adulte, on retrouve plusieurs sites qui supportent l'hématopoïèse. Le premier site d'hématopoïèse retrouvé lors de l'embryogénèse est le sac vitellin. Les cellules souches proviennent du mésoderme ventral et migrent vers le sac vitellin afin d'y former des îlots de cellules sanguines.<sup>4;5</sup> Ces cellules vont surtout devenir des globules rouges, des mégacaryocytes et des monocytes. On retrouve également une autre population de cellules souches dans la région de l'*aorta-gonad mesonephros*. Cette population deviendra l'initiatrice de l'hématopoïèse définitive premièrement dans le foie fœtal et la rate pour ensuite se diriger vers la moelle osseuse qui, au cours de la vie adulte, deviendra le site primaire et unique de l'hématopoïèse.<sup>4;6</sup>

### **1.1 Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)**

Les cellules « maîtres » de l'hématopoïèse sont les cellules souches. Elles représentent environ 0.005 à 0.01 %<sup>7-10</sup> de la moelle osseuse totale (1 cellule sur 10 000 est une cellule souche). La réserve de ces cellules souches est principalement formée durant l'embryogenèse dans différents organes tel que le foie fœtal. Elles migrent ensuite vers la moelle osseuse où leur maintenance s'effectuera par différents éléments. Alors que les cellules souches sont en expansion rapide dans le foie fœtal pour créer la réserve de CSH, elles sont plutôt quiescentes dans la moelle osseuse et elles ne se divisent que pour subvenir au besoin en nouvelles cellules.<sup>2;11;12</sup> Selon Spangrude et al., les CSH murines sont caractérisées par différents marqueurs. Elles expriment fortement le marqueur SCA-1 (*stem cell antigen*) et très faiblement les marqueurs Thy-1.1 et Lin (SCA-1<sup>hi</sup>, Thy-1.1<sup>lo</sup> Lin<sup>-/lo</sup>).<sup>7;13</sup> Cette population est hautement enrichie en cellules souches mais elle contient aussi des progéniteurs multipotents.<sup>8;14</sup> Depuis, l'isolation des CSH a été redéfinie par d'autres groupes et maintenant, par définition, la population de CSH est appelée « KLS » pour Kit<sup>+</sup> (C-Kit), SCA-1<sup>+</sup> et Lin<sup>-</sup>.<sup>15;16</sup> Les analyses de cycle cellulaire ont démontré que 15 à 20% des cellules de cette population étaient en cycle afin d'assurer le maintien de l'homéostasie du système sanguin. Cependant, 4% des cellules qui cyclent sont considérées comme étant des cellules ayant une capacité de régénération hématopoïétique à long-terme (CSH) alors que 18% sont des cellules sont des progéniteurs ayant un potentiel de reconstitution hématopoïétique à court terme.<sup>17-</sup>

<sup>19</sup> Les cellules souches ont deux qualités très importantes qui n'appartiennent qu'à celles-ci : elles ont la capacité de s'auto-renouveler, c'est-à-dire qu'elles peuvent,

en se divisant, donner naissance à deux cellules filles qui seront également des cellules souches, et elles ont également la capacité de donner naissance à toutes les cellules matures du sang pour maintenir et réparer l'homéostasie hématopoïétique. En effet, les CSH peuvent se diviser de trois façons différentes :

- 1) Elles peuvent donner naissance à deux cellules progénitrices ayant perdu la capacité d'auto-renouvellement qui s'engageront dans une lignée cellulaire déterminée. Ceci provoque la perte de la CSH et permet d'assurer la production de cellules matures qui iront peupler le sang et les organes lymphoïdes.
- 2) Elles peuvent produire une cellule progénitrice différenciée et une cellule souche, entraînant un maintien de la réserve de cellules souches.
- 3) Elles peuvent donner naissance à deux cellules souches, donc entraîner une expansion de la réserve de CSH (phénomène observé principalement lors de l'embryogénèse).

Les cellules souches dites de long terme ont un pouvoir théorique d'auto-renouvellement infini. Il existe également des cellules souches dites de court terme, qui ont une capacité d'auto-renouvellement limitée. Finalement, lorsqu'une cellule souche devient un progéniteur multipotent, elle perd son pouvoir d'auto-renouvellement.<sup>7;8;20</sup>

## **1.2 La niche hématopoïétique**

La majorité des CSH se retrouvent dans la moelle osseuse dans des endroits appelés niches hématopoïétiques. La niche est un microenvironnement qui fournit des contacts cellules-cellules responsables de la prolifération et l'inhibition de la

différenciation des CSH.<sup>21;22</sup> On retrouve deux types de niches : la niche « osseuse » et la niche vasculaire. La première est située au niveau de la surface osseuse tandis que la deuxième est située près d'un vaisseau sanguin. Des études ont démontré que les cellules souches nichées près de l'os sont plus quiescentes que celles se trouvant dans la niche vasculaire.<sup>23;24</sup> Peu d'informations sont connues à propos des signaux échangés entre les cellules de la niche et les CSH. Par contre, certains facteurs solubles ou récepteurs sont exprimés par les CSH et les cellules de la niche. Le *Stem cell factor (SCF)* ou *steel factor* est une cytokine à la fois membranaire et soluble. Il se lie et active le C-Kit qui est grandement exprimé par les CSH. Des études ont démontré que le *SCF* et C-Kit sont essentiels pour le maintien à long terme et l'auto-renouvellement des CSH adultes soulevant la possibilité que cette voie de signalisation soit impliquée particulièrement dans la niche dite osseuse.<sup>21;25</sup> En effet, il a été démontré que des souris mutantes pour le C-Kit ont une déficience en cellules souches et les souris déficientes pour le ligand de C-Kit ont un défaut dans leur microenvironnement.<sup>16;26-32</sup> Les chercheurs croient également que les ostéoclastes et d'autres facteurs d'adhésion cellulaire telle que la N-cadhérine et la  $\beta$ -intégrine, seraient impliqués dans la régulation des CSH dans la niche « osseuse ».<sup>23;33</sup> La moelle osseuse fournit également un environnement aux cellules souches qui entrent dans le processus de différenciation. Cet environnement comprend des adipocytes, cellules endothéliales, fibroblastes et macrophages que l'on nomme cellules stromales. Elles influencent la différenciation de la CSH par l'apport de leur matrice cellulaire ainsi que par la sécrétion de facteurs de croissance

membranaires et solubles essentiels à la survie, la prolifération et la maturation des CSH dans les lignées hématopoïétiques.<sup>1</sup>

### **1.2.1 Le homing**

Avant de s'installer définitivement dans la moelle osseuse, les cellules présentes dans le foie fœtal doivent migrer afin de s'y rendre. Ce phénomène s'appelle le « homing ». La migration des cellules souches est dépendante des interactions des molécules d'adhésion entre la cellule souche, l'endothélium sinusoidal, les cellules stromales et la matrice médullaire.<sup>34;35</sup> Ce processus nécessite des chimio-attractants comme la chémokine SDF1 et son récepteur CXCR4. Il a été démontré que les souris ayant une déficience soit du récepteur ou de la chémokine meurent prématurément puisque les CSH ne peuvent migrer du foie fœtal vers la moelle osseuse où l'hématopoïèse définitive doit s'installer.<sup>34;36;37</sup>

### **1.2.2 Le contrôle de l'auto-renouvellement dans la niche**

Certains récepteurs tels que le Bmpr1 (*bone morphogenic protein receptor 1*) ou le récepteur de l'hormone parathyroïdienne sont impliqués dans le contrôle de l'auto-renouvellement des cellules souches. Les ostéoclastes présents dans la niche sécrètent un facteur, l'angiopoïétine-1 qui interagit avec son récepteur Tie/Tek exprimé à la surface de la cellule souches aidant celle-ci à l'adhérence à la niche, la quiescence et la survie.<sup>11;38</sup> Le facteur Myc est également un acteur



d'envergure dans la régulation de l'auto-renouvellement. La perte de Myc provoque une expansion incontrôlable des cellules souches et une perte de la différenciation de ces dernières.<sup>11;39</sup> Les facteurs impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire sont aussi impliqués dans la régulation de l'auto-renouvellement. Parmi ces facteurs on retrouve les inhibiteurs du cycle cellulaire P21 et P18 et les facteurs de transcription Stat3 et 5 impliqués dans la voie de signalisation JAK-STAT. D'autres signaux sont également impliqués dont Notch, Wnt, Sonic hedgehog et BMI-1. La régulation de l'auto-renouvellement des cellules souches est donc un mécanisme complexe qui demande une grande précision dans la balance du cycle cellulaire.<sup>23;40-44</sup>

### **1.3 Facteurs de croissance**

Peu de facteurs sont connus pour contribuer au développement des cellules souches et les mécanismes par lesquels ils opèrent sont encore moins connus. Nous savons que la thrombopoïétine et le ligand C-Kit et leur ligand respectif c-mpl et C-Kit, ont une action directe sur les CSH.<sup>15;45-51</sup> Entre autre, Thorén et al. suggèrent que non seulement le C-Kit régulerait le maintien à long terme mais il serait également impliqué dans la quiescence des CSH.<sup>52</sup> Il est également un facteur de survie cellulaire qui peut, en collaboration avec d'autres cytokines, faciliter la prolifération des CSH.<sup>25;46;52;53</sup> On trouve également des cytokines, appartenant à la famille des hématopoïétines, qui sont des facteurs présents pour contrôler la survie et la prolifération des cellules souches et des cellules matures.

Ces facteurs agissent en transmettant des messages biologiques afin d'activer des voies biologiques sur une cellule donnée. Parmi les cytokines agissant sur les progéniteurs les plus primitifs on compte l'interleukine-3, 6 et 11 ainsi que le G-CSF.<sup>1</sup>

#### **1.4 Différenciation et engagement dans une lignée**

L'engagement dans une lignée se définit par la restriction d'un progéniteur multipotent à s'engager dans une lignée définie pour éventuellement devenir un progéniteur engagé ou encore une cellule mature pouvant accomplir ses fonctions. Cette restriction d'engagement est un point de non retour, c'est-à-dire que le progéniteur restreint sera définitivement une cellule de la lignée dans laquelle il s'est engagé. Ce processus établit la balance entre le nombre de cellules myéloïdes versus le nombre de cellules lymphoïdes. Lorsque la cellule souche se différencie, elle devient d'abord une cellule souche dite de « court terme » et ensuite un progéniteur multipotent (MPP pour *multipotent progenitor*). Ces deux types de cellules ont encore la capacité de devenir n'importe quelle cellule sanguine mais la différence réside dans la capacité d'auto-renouvellement.<sup>54-57</sup> Plus la cellule souche avance dans le processus de différenciation, moins elle possède cette capacité d'auto-renouvellement.<sup>58-60</sup> Par la suite, le progéniteur multipotent devient un progéniteur unipotent qui a la capacité de se différencier soit dans la lignée lymphoïde ou soit dans la lignée myéloïde. Ces progéniteurs unipotents sont les CLP (*common lymphocyte progenitor*) qui peuvent devenir une cellule B, T ou NK (*natural killer*) et les CMP (*common myeloid progenitor*)

qui peuvent donner naissance aux mégacaryocytes, érythrocytes, granulocytes, macrophages, monocytes et cellules dendritiques.<sup>54;56;57</sup>

### **1.5 Les CMP**

Les CMP et CLP sont les premiers progéniteurs compartimentés qui se différencieront chacun dans leur lignée, c'est-à-dire myéloïde et lymphoïde respectivement. Alors que le CLP exprime le récepteur de l'interleukine-7<sup>7;58;61</sup>, Akashi et al.<sup>58</sup> ont cherché une fraction négative pour ce récepteur afin de caractériser les progéniteurs myéloïdes. Ils ont alors décrit le CMP comme ayant le récepteur C-Kit mais étant négatif pour le récepteur de l'interleukine-7, le SCA-1 et également pour les marqueurs spécifiques d'engagement dans une lignée (*Lineage* négatif, Lin-). Selon l'expression de CD34 et du FcγR-II/III, il est possible définir plus précisément ces progéniteurs. Ainsi, les cellules exprimant fortement à la fois le CD34 et le FcγR-II/III peuvent se différencier seulement en macrophages et en granulocytes. Ils se nomment GMP pour progéniteurs des granulocytes/macrophages. Les cellules exprimant le FcγR-II/III faiblement mais pas le CD34 sont restreintes à se différencier en mégacaryocytes ou en érythrocytes. Elles se nomment MEP pour progéniteur mégacaryocyte/érythroïde. Les cellules exprimant le CD34 et faiblement le FcγR-II/III sont définies comme étant les CMP puisqu'elles peuvent donner naissance à toutes les cellules myéloïdes.<sup>58</sup>

## **1.6 Les CLP**

Le premier pas vers l'engagement dans la lignée lymphoïde est l'expression par les MPP du récepteur FLT3. L'apparition de ce récepteur marque la perte des caractéristiques des CSH ainsi que de leur potentiel de différenciation myéloïde.<sup>62;63</sup> Il a été démontré que les souris déficientes pour ce récepteur avaient une diminution dans la quantité de CLP qu'elles produisaient.<sup>62;64</sup> Les CLP expriment à leur surface le récepteur de l'interleukine-7 (IL-7R $\alpha$ ) en grande quantité ainsi que C-Kit et SCA-1 de façon plus modérée. Ils ne présentent aucun marqueur d'engagement dans une lignée et sont donc, comme les CMP, Lin<sup>-</sup>. Cette population équivaut à environ 0.02% de la moelle osseuse totale et elle est restreinte à la lignée lymphoïde,<sup>7</sup> pouvant donc devenir des lymphocytes B, des lymphocytes T, des cellules NK et des cellules dendritiques.<sup>7;65;66</sup> L'interleukine-7 est une cytokine essentielle non seulement pour la survie des cellules B mais pour la différenciation des CLP en lymphocytes B.<sup>65;67</sup> Le développement des cellules T s'effectue dans le thymus alors que le développement des cellules B débute dans la moelle osseuse pour aller terminer sa maturation finale dans les organes lymphoïdes périphériques tels que les ganglions.<sup>4;68;69</sup>

### **1.6.1 Les cellules B**

Sur la totalité des lymphocytes retrouvés dans le corps humain, environ 5 à 15% sont des lymphocytes B. La fonction principale des cellules B est de produire et

secréter des anticorps solubles qui reconnaîtront des antigènes spécifiques. Les lymphocytes B se développent et mûrissent dans la moelle osseuse à partir de leurs progéniteurs, les CLP. Lorsqu'elles deviennent fonctionnelles, ces cellules migrent dans le flot sanguin et dans les organes lymphatiques secondaires tels que la rate et les ganglions lymphatiques. C'est dans ces organes que la reconnaissance antigénique s'effectue. Suite à cette reconnaissance, les cellules B deviennent soit des plasmocytes soit des cellules mémoires qui continueront d'effectuer une surveillance immune puisqu'elles conservent leur spécificité antigénique sur une très longue période de temps.<sup>70</sup>

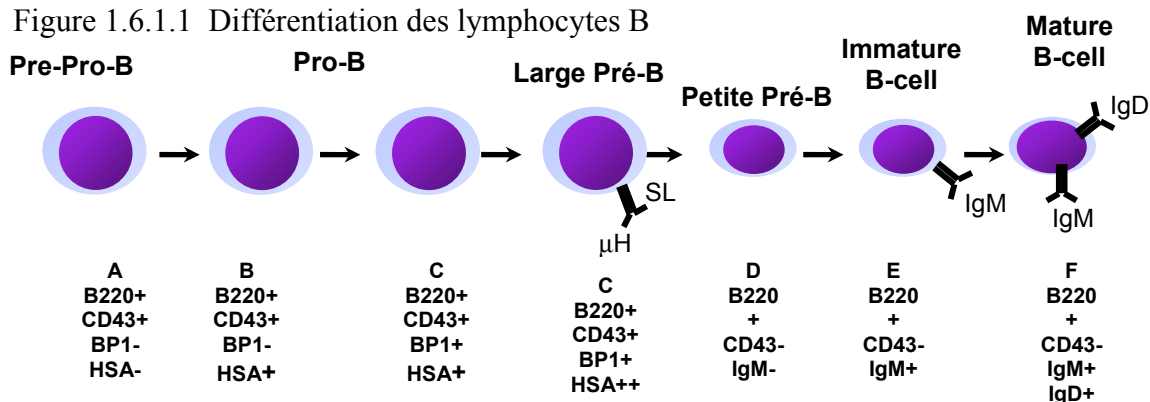
#### **1.6.1.1 Différenciation en lymphocytes B**

La différenciation des cellules lymphoïdes B se déroule en une série d'étapes permettant à la cellule d'effectuer un réarrangement unique et productif de son récepteur qui est en fait une immunoglobuline de surface.<sup>71-74</sup> Une fois engagée dans la lignée B, les cellules expriment le marqueur B220 qui marque l'appartenance aux lymphocytes B.<sup>65;75;76</sup> La différenciation se produit en 6 étapes. Au tout début, la fraction A, appelé aussi cellule pré-pro B, débute le réarrangement  $D_H-J_H$  qui se complètera alors que la cellule passera à la fraction B nommé pro-B.<sup>65;77-79</sup> Puis, la cellule commence à réarranger les chaînes lourdes ( $V_H-D_HJ_H$ ) de l'immunoglobuline pour devenir une cellule pro-B tardive (fraction C) et cela résulte en l'expression d'un pré-récepteur B ayant une chaîne légère de substitution et de la chaîne lourde ( $\mu$ ), récepteur ayant un rôle lors du passage de

la fraction C vers la fraction D. L'activation du pré-récepteur B envoie un signal permettant l'expansion de ces cellules ainsi que l'exclusion allélique du locus IgH, c'est-à-dire que toutes les cellules ayant produit un réarrangement non productif avec aucun des deux allèles sont éliminées. Ensuite, les cellules se différencient en cellules pré-B (fraction D) qui débutent le réarrangement de leurs chaînes légères. Lorsque ce réarrangement est productif, les petites cellules pré-B deviennent des cellules B immatures exprimant l'immunoglobuline de surface M (fraction E) comme récepteur. Toutes les cellules dont l'IgM réagit avec les antigènes du soi seront éliminées par apoptose à ce stade.<sup>71;80</sup> Puis, les cellules immatures (ou naïves) partent de la moelle osseuse pour se rendre dans les organes lymphoïdes périphériques où elles pourront éventuellement répondre à des antigènes et ainsi causer une réponse immunitaire et devenir des cellules matures (fraction F) exprimant l'immunoglobuline de surface D conjointement avec l'IgM.<sup>71;80</sup> Il est possible de définir chacun des stades de différenciation B grâce à des molécules de surface qui sont propres à chacune des fractions. Le marqueur B220 est présent dès le début et restera à la surface cellulaire tout le long du processus de différenciation. On retrouve également le CD43 qui est présent sur les fractions les plus immatures de l'ontogénie, soit les fractions A, B et C et celui-ci disparaît et n'est plus présent sur les fractions D, E et F. Pour distinguer les fractions A et B, on retrouve le CD24 ou HSA (*heat stable antigen*) qui est exprimé par les fractions B et C et finalement pour séparer B et C, il y a le BP-1 qu'on retrouve uniquement sur la fraction C. Quant à la fraction D, elle n'exprime que le B220 et finalement on passe à la fraction E lorsque la cellule

exprime l'immunoglobuline membranaire M. La fraction mature F exprime quand à elle, en plus du B220, les immunoglobulines M et D.<sup>77</sup>

Figure 1.6.1.1 Différentiation des lymphocytes B



### 1.6.1.2 Facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules B

Certains gènes ont été identifiés comme étant nécessaire à la différenciation des CLP en cellules lymphoïdes. Plus précisément, 6 facteurs de transcription, Pu.1, *Ikaros*, E2A, Bcl11a, EBF et Pax-5 ont été décrits dans la littérature comme jouant un rôle important dans le développement des lymphocytes B.<sup>62;64;81-88</sup> Des facteurs de transcription de la famille des doigts de zinc, notamment *Ikaros*, ont été décrits comme étant requis pour le développement de toutes les cellules lymphoïdes.<sup>65;81;89;90</sup> Les souris possédant une délétion homozygote pour ce gène ont un arrêt de développement au stade Pro/pré-B.<sup>65;91</sup> *Ikaros* influence les décisions primaires dans la promotion de la différenciation lymphocytaire au dépend de la lignée myéloïde permettant ainsi l'engagement de la CSH dans la lignée lymphoïde.<sup>65;89</sup> Un autre gène également important dans la balance entre la lignée myéloïde et lymphoïde est PU.1. Ce gène agissant sur les progéniteurs

myélo-lymphocytaire contrôle la prolifération, la survie et la différenciation dépendante des cytokines des progéniteurs multipotents.<sup>65;92;93</sup> Dans un modèle PU.1<sup>-/-</sup>, les cellules B sont induites alors qu'au contraire, dans un modèle où PU.1 est en grande quantité, les cellules B sont éliminées au détriment des cellules myéloïdes, plus précisément des macrophages.<sup>65;94</sup> Une fois que le progéniteur est engagé dans la différenciation B, d'autres facteurs de transcription prennent la relève. Les facteurs E2A et EBF sont des facteurs agissant précocement dans la spécification des cellules B en régulant les premiers gènes exprimés par les lymphocytes B. Le facteur E2A encode deux protéines dites « helix-loop-helix », E12 et E47.<sup>65;95</sup> Les cellules B nulles pour E2A arrêtent dans un stade précoce sans avoir eu de réarrangement dans le locus IgH.<sup>65;82;83</sup> De plus, les cellules nulles pour la protéine E2A n'expriment pas Pax-5.<sup>65;82;83;96</sup> Le facteur EBF est une protéine en doigt de zinc « helix-loop-helix » exprimé seulement dans le compartiment B, plus précisément dans les cellules pro-B et pré-B.<sup>62;65;97;98</sup> Lorsqu'il est absent, il empêche la transcription du gène RAG-1/2 et quelques autres gènes dont Pax5.<sup>65;84</sup> Ce dernier est un facteur de transcription nécessaire aux cellules B et il est régulé par EBF et E2A ensembles. Les facteurs E2A et EBF ne sont pas suffisants à la différenciation B sans la présence de Pax5. Contrairement aux facteurs E2A et EBF, le facteur Pax5 n'est pas impliqué dans la spécification B mais dans l'engagement définitif des lymphocytes B. Ainsi, les cellules pro-B (fraction B) Pax5<sup>-/-</sup> démontrent un potentiel lympho-myélocytaire comme si elles étaient des progéniteurs indifférenciés et elles ont un potentiel de



développement erythro-myélocytaire.<sup>65;85;99-102</sup> Pax5 est exprimé seulement à partir de la fraction A mais demeure tout au long de la différenciation B.<sup>65;103</sup>

### **1.6.1.3 Cytokines et récepteurs de cytokines impliqués dans le développement B**

Il y a deux récepteurs de cytokines importants au bon développement des lymphocytes B. Il s'agit du récepteur à l'interleukine-7 et du récepteur FLT-3. Le FLT3 est un récepteur tyrosine kinase exprimé principalement sur les cellules les plus immatures. Ce récepteur et son ligand sont importants dans la génération et le maintien des CLP et il a été démontré que les cellules B précoces étaient affectées par une déficience du ligand FLT3.<sup>25;45;64;104-107</sup> L'interleukine-7 est une cytokine très importante pour le développement et le maintien du système immunitaire. Elle est constamment produite, entre autres, par les cellules stromales de la moelle osseuse. Cette cytokine est principalement impliquée de façon importante dans le développement et la prolifération des lymphocytes B et T.<sup>108-111</sup> En absence du signal de l'interleukine-7, les CLP ne peuvent pas produire assez de facteurs de transcription essentiels aux lymphocytes B et ils perdent leur potentiel de différenciation B tout en conservant celui des cellules T et NK.<sup>109</sup> Il est suggéré que le récepteur FLT3 induit l'expression du récepteur de l'interleukine-7 et que ce dernier induit la différenciation des CLP vers les lymphocytes B. Les lymphocytes B continuent d'exprimer l'IL-7R durant leur développement et ce, jusqu'à la maturation de ces cellules. Il semble que les facteurs *Ikaros* et PU.1 seraient responsables de la régulation des récepteurs FLT3 et IL-7R. Les mutations nulles de ces deux facteurs entraînent une grande diminution des niveaux de transcription du récepteur FLT3 ce qui entraîne une diminution du

récepteur de l'interleukine-7. De plus, PU.1 est directement impliqué dans la régulation de la chaîne alpha de l'IL-7R.<sup>62;112-114</sup>

## **2. Désordre hématopoïétique**

Les cellules de notre système sanguin meurent et se renouvellent chaque jour en grande quantité. La formation de ces nouvelles cellules est régulée par des mécanismes précis de façon à ce que l'homéostasie ne soit pas débalancée. Cependant, il arrive parfois que les cellules de moelle osseuse ne répondent plus à ces mécanismes et elles ne mûrissent pas comme elles le devraient. Survient alors un blocage de la maturation et une accumulation de cellules immatures dans l'organe, dû à une prolifération incontrôlée d'une cellule non mature. Ces cellules infiltrent la moelle osseuse et causent une leucémie, c'est-à-dire un cancer du sang. Il existe plusieurs types de cette maladie dépendamment de la lignée atteinte et de la sévérité des symptômes. Des translocations entre chromosomes sont souvent à l'origine de cette maladie.

### **2.1 Leucémie lymphoblastique aigüe et chronique**

Comme son nom l'indique, cette leucémie est caractérisée par l'accumulation de cellules lymphoïdes d'aspect souvent mature alors qu'elles ne le sont pas. L'accumulation de ces cellules leucémiques se fait au niveau de la moelle osseuse, du sang, de la rate et des ganglions lymphatiques. Il existe deux types de leucémie lymphoblastique : la forme aiguë et la forme chronique. Dans la forme

chronique de la maladie, nous pouvons suivre les cellules malignes grâce à leur expression accrue du marqueur CD5.<sup>115;116</sup>

## **2.2. Le lymphome non hodgkinien**

Le lymphome non hodgkinien est un cancer originant des cellules lymphoïdes et retrouvé principalement dans les organes lymphoïdes comme les ganglions. Le lymphome non hodgkinien le plus fréquemment retrouvé est le lymphome folliculaire.<sup>117</sup> Il est possible de pouvoir trouver les cellules cancéreuses dans certains cas grâce à un marqueur génétique particulier aux lymphomes non hodgkinien : la translocation t (14 :18). Cette translocation, présente dans 30% des LNH, provoque la fusion de l'oncogène BCL-2 (anti-apoptotique) avec la chaîne lourde des immunoglobulines. Les cellules portant cette translocation ont une expression constante de BCL-2 empêchant cette dernière d'entrer en apoptose. Il est possible de détecter cette translocation grâce à deux points de cassures : le MBR présent dans 66% des cas et le MCR présent dans 5% des cas.<sup>118;119</sup>

## **2.3 Leucémie myéloïde aiguë**

La leucémie myéloblastique survient lorsqu'il y a un blocage dans la maturation et une accumulation de cellules immatures myéloïdes dans la moelle osseuse. Puisque les cellules immatures prennent de plus en plus de place dans la moelle osseuse, il y a de moins en moins de possibilité pour que les progéniteurs

normaux puissent proliférer et se différencier. Il y a alors une pénurie de cellules matures dans le sang pouvant provoquer une granulocytopenie, une thrombocytopénie ou encore de l'anémie. Le système sanguin s'en trouve altéré et, si la maladie demeure non traitée, le patient peut décéder très rapidement. Tout comme les leucémies lymphoblastiques, il existe également une forme chronique de cette maladie.<sup>120</sup>

### **3. Greffe de cellules souches hématopoïétiques**

Afin de traiter les patients atteints de cancer ou autre maladie attaquant la moelle osseuse, il est possible de recourir à une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Dans les modèles animaux, il a été démontré que d'effectuer des greffes identiques au point de vue génétique (greffe syngénique) ou encore des greffes où l'animal reçoit ses propres cellules (greffe autologue) pouvaient éviter que les animaux ne meurent.<sup>121-123</sup> Les greffes non génétiquement compatibles (greffe allogénique) permettent le prolongement de la vie. Par contre, ce type de greffe entraîne souvent des complications immunologiques. En effet, les lymphocytes T du donneur reconnaissent leur « nouvel environnement » comme étant du « non-soi » ce qui résulte en une maladie du greffon contre l'hôte (GVHD for *graft-versus-host disease*) c'est-à-dire que le greffon induit une réaction de rejet contre le sujet greffé. Cette maladie est en grande partie due au non appariement des molécules de HLA (complexe majeur d'histocompatibilité) et dans une plus petite mesure, la GVHD peut également être causée par les antigènes d'histocompatibilité mineurs.<sup>121;124;125</sup> La transplantation autologue permet d'éviter le développement de la GVHD. Alors que le taux de mortalité

chez les patients ayant reçu une greffe allogénique est de 10-20 %, la majorité de ceux-ci vont mourir suite à des complications relatives à la greffe. Par ailleurs, les greffes autologues présentent seulement 2% de mortalité.<sup>121</sup>

### **3.1 Sources de cellules souches hématopoïétiques**

#### **3.1.1 La moelle osseuse**

La moelle osseuse est la source par excellence de CSH puisque ces dernières sont nichées au creux de cet organe. Il est possible d'obtenir de la moelle osseuse par aspiration dans l'os de la crête iliaque. De nos jours, le sang mobilisé a remplacé la ponction de moelle. Les cellules du système sanguin, incluant les cellules souches, entrent et ressortent constamment du flot sanguin. Les cellules souches peuvent ainsi se retrouver dans le sang et être récoltées à des fins de greffe. Par contre, comme le sang possède plus de cellules T que la moelle osseuse, l'incidence de GVHD suite à ce type de prélèvement augmentera.<sup>121;126</sup> Afin d'enrichir la réserve de CSH dans le sang, on procède à une mobilisation, c'est-à-dire qu'on administre au donneur le facteur de croissance G-CSF (*Granulocyte colony-stimulating factor*). Cette cytokine permet la dégradation par des protéases des protéines qui lient les cellules souches à leur niche. Il est ensuite possible de recueillir les CSH à même le sang du patient.<sup>121;127</sup>

### **3.1.2 Le sang de cordon ombilical**

S'il est impossible de trouver un donneur ou encore que la transplantation est nécessaire rapidement, il est possible d'utiliser le sang de cordon ombilical. Cette procédure est facile et sécuritaire. Le sang de cordon est riche en cellules souches mais malheureusement on y retrouve un petit volume sanguin. La greffe de sang de cordon requiert moins de restriction dans l'appariement des HLA qu'une greffe de cellules souches entre adultes, il y a donc moins de chance qu'une GVHD se développe. Par contre, comme le greffon est plus lent à reconstituer le receveur, il arrive fréquemment que les patients développent des infections suite à leur transplantation.<sup>121;128</sup>

### **3.2 Limites de la greffe de cellules souches hématopoïétiques**

Une limitation importante à la greffe de cellules souches est le nombre parfois insuffisant de ces dernières. Par exemple, dans le cas d'une transplantation de sang de cordon, il est particulièrement difficile d'identifier un greffon de sang de cordon avec suffisamment de CSH pour greffer un adulte avec un seul échantillon. Si on souhaite faire une greffe autologue, nous arrivons parfois au même problème : suite à des traitements de chimio/radiothérapie intensifs, le greffon du patient se peut être trop pauvre en cellules souches pour permettre une reconstitution rapide et efficace du système hématopoïétique. Certains essais ont permis, dans un milieu sans sérum et avec une panoplie de cytokines, d'obtenir une expansion de 3 fois du nombre de cellules souches. Toutefois, cette expansion n'est pas suffisamment significative pour être bénéfique dans des applications

cliniques.<sup>129-131</sup> Plusieurs autres essais ont été faits avec différents agents, avec des succès mitigés. De cette problématique est né le besoin de réaliser une expansion des cellules souches dans un contexte clinique.

#### **4. Les facteurs de transcription de la famille HOX**

Les gènes homéobox (HOX) sont des gènes extrêmement bien conservés à travers l'évolution puisqu'ils sont nécessaires au développement architectural du corps lors de l'embryogénèse. L'expression d'un gène HOX donné régule le développement d'un segment corporel de façon spécifique. Ainsi, les gènes situés en 3' cordonnent les segments antérieurs du corps et les gènes situés en 5' sont impliqués avec le développement des segments postérieurs. Même si les gènes HOX ont un rôle bien défini lors de l'embryogénèse, très peu d'informations sont connues à propos de leur régulation et de leur mécanisme d'action.<sup>132-134</sup> Chez l'humain, on compte 39 gènes HOX divisés en 4 « *cluster* » : A, B, C et D. Au terme de l'évolution, les 4 clusters se sont dupliqués par *trans* amplification alors que dans un même cluster, les différents gènes se sont dupliqués par *cis* amplification ce qui permet une redondance fonctionnelle entre les différents gènes et clusters.<sup>135-137</sup> Les gènes HOX possèdent une séquence de 183 paires de bases codant pour un homéodomaine de 61 acides aminés qui est hautement conservé.<sup>132;138;139</sup> Cet homéodomaine possède un motif « *helix-turn-helix* » qui reconnaît et se lie à des séquences de liaison de gènes spécifiques entraînant la régulation de la transcription de ces gènes cibles.<sup>132;133;135;138-140</sup>

#### **4.1 Régulation des gènes HOX**

Trois régulateurs des gènes HOX ont été décrits : l'acide rétinoïque, les estrogènes et la vitamine D. L'acide rétinoïque serait impliqué au début de l'embryogénèse puisqu'il active les gènes HOX en 3'.<sup>132;141</sup> Les estrogènes sont nécessaires lors du développement embryonnaire afin d'assurer le développement du tractus reproductif féminin. De plus, ils sont impliqués plus tard dans l'embryogénèse puisqu'ils régulent les gènes HOX situés en 5'.<sup>132;142-144</sup> Tout comme les estrogènes, la vitamine D est impliquée dans le développement du tractus reproducteur féminin mais également dans le développement de l'hématopoïèse. La vitamine D transformée en son composé actif se lie à son récepteur et régule les gènes cibles.<sup>132</sup>

#### **4.2 Les cofacteurs de HOX**

Nous savons maintenant que les gènes HOX ont des interactions avec d'autres gènes ayant un site de liaison à l'ADN, ce qui modifie la spécificité des interactions des gènes HOX avec l'ADN. Par contre, cet effet diffère selon les différents gènes HOX. Ces gènes ont également été impliqués dans le positionnement des segments corporels lors de l'embryogénèse.<sup>145-148</sup> Il existe une séquence hexapeptidique constituée de 4 résidus YPWM située dans la portion N-terminale de l'homéodomaine. Cette séquence, hautement conservée dans les



groupes paralogues 1 à 8, est très importante pour les interactions avec les cofacteurs.<sup>135;149</sup> Parmi ces cofacteurs, nous retrouvons PBX qui interagit avec les gènes paralogues 1 à 10, se liant au motif YPWM (1 à 8) et un résidu Trp (9 et 10)<sup>135;149;150</sup> et MEIS qui interagit avec les gènes paralogues 11 à 13. Ces deux facteurs sont membres de la famille TALE, famille de protéines ayant un homéodomaine.<sup>135;151</sup> Il existe cependant d'autres protéines qui peuvent interagir en tant que cofacteurs avec les membres de la famille HOX.<sup>145</sup>

#### **4.3 Les gènes HOX dans l'hématopoïèse**

Même si les gènes HOX jouent un rôle important dans l'embryogénèse, ils demeurent tout de même exprimés dans d'autres tissus tout au long de la vie adulte. Ainsi, les gènes HOX sont retrouvés dans les cellules qui constituent le système hématopoïétique.<sup>132;152;153</sup> Tout comme dans l'embryogénèse, les gènes situés en 3' sont exprimés dans les cellules les plus immatures (cellules souches, progéniteurs) alors que ceux situés en 5' sont retrouvés dans les cellules plus matures.<sup>132;154;155</sup> Des études sur des lignées immortalisées humaines et murines ont démontré que les gènes présents sur le cluster HOXB étaient associés avec la lignée érythroïde, que les gènes du cluster HOXA étaient rattachés aux cellules myéloïdes et finalement les gènes du cluster HOXC associés à la lignée lymphoïdes. Quant aux gènes du locus D, ils ne semblent pas vraiment exprimés dans les cellules hématopoïétiques.<sup>152;156-162</sup>

#### **4.4 HOXB4 et auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques**

Nous avons très peu d'indices sur les mécanismes qui régulent l'auto-renouvellement des cellules souches. Certaines études ont démontré que les facteurs de transcription STAT5 et STAT3 sont des régulateurs positifs de l'auto-renouvellement. Outre ces facteurs de transcription, le groupe polycomb BMI-1, aidé de ses partenaires, favorise l'auto-renouvellement des CSH via plusieurs voies moléculaires.<sup>23;40-44</sup> Parmi les facteurs pouvant permettre la régulation de l'auto-renouvellement, on trouve aussi le facteur de transcription HOXB4, membre de la famille des *Homéobox*. Plusieurs études ont été faites dans le but de déterminer si les gènes de la famille HOX étaient présents dans les cellules du système sanguin. Dans l'une de ces études, une analyse des cellules CD34+ (marqueur de cellules souches chez l'humain) a montré que les gènes situés en 3' comme HOXB4 étaient préférentiellement exprimés dans la population contenant les cellules les plus primitives incluant les CD34+. Par la suite, des essais de transplantation de moelle osseuse chez la souris ont montré que la surexpression de HOXB4 dans les cellules hématopoïétiques peut promouvoir la régénération de la réserve de cellules souches suite à la transplantation et ainsi participer à la régulation l'auto-renouvellement des cellules souches.<sup>163-165</sup> Sauvageau et al.<sup>163;165</sup> ont démontré que des receveurs ayant été transplantés avec des cellules de moelle osseuse surexprimant le gène HOXB4 pouvaient voir leur nombre de cellules souches augmenter de 47 fois par rapport au contrôle. Non seulement les cellules souches s'expandent lors d'une première transplantation, mais également à la

suite d'une seconde transplantation. Fait important à noter, le facteur de transcription HOXB4 permet une expansion de la réserve de cellules souches et cette expansion permet d'atteindre les valeurs pré-transplantation de cellules souches dans la réserve sans toutefois dépasser la limite biologique des cellules contenues dans cette réserve. HOXB4 agit donc sur les cellules souches tout en respectant les mécanismes de régulation *in vivo* déjà existants dans le receveur et aucune transformation maligne n'est observée suite à la surexpression du facteur HOXB4 puisque les limites de la réserve de cellules souches ne sont pas dépassées. Un deuxième point important est que l'expansion des cellules souches est polyclonale.<sup>163</sup> La polyclonalité est un concept important pour l'hématopoïèse puisque cela prouve que plus d'une CSH a participé à la reconstitution du système sanguin, donc il n'y a pas de prolifération anarchique d'une seule cellule souche. Toutes ces données suggèrent que la protéine HOXB4 est un facteur ayant la possibilité d'être utilisé en clinique afin d'expandre des cellules souches pour la greffe. Cependant, les thérapies géniques présentent une utilisation clinique limitée pour traiter les maladies humaines, vu la possibilité de leucémogénèse induite. Dans le but de contourner ce problème, Sauvageau et al.<sup>166</sup> ont créé une protéine soluble, TAT-HOXB4, et ils ont démontré que cette protéine HOXB4 pouvait expandre les cellules souches hématopoïétiques murines. Une fois dans le milieu en présence des cellules, la protéine de fusion TAT-HOXB4 pénètre dans le cytoplasme et se transloque rapidement au noyau à des niveaux similaires à ceux retrouvés dans les cellules surexprimant le HOXB4. Tout comme la surexpression, TAT-HOXB4 permet une expansion de la réserve de cellules

souches mais également une reconstitution lymphomyéloïde du sujet greffé. Cette protéine de fusion serait donc une alternative forte intéressante pour l'expansion des cellules souches à des fins cliniques.

#### **4.4.1 Limitations de la protéine HOXB4**

La protéine HOXB4 offre un grand potentiel d'expansion des cellules souches dans un contexte clinique afin d'augmenter la quantité de ces cellules dans les greffons autologues. Des expériences chez la souris ont cependant démontré que les cellules surexprimant HOXB4 semblent promouvoir une expansion des lignées myéloïdes et avec un effet inverse au niveau des cellules lymphoïdes. Effectivement, les receveurs ayant reçu des cellules surexprimant HOXB4 démontrent une augmentation de la reconstitution myéloïde au détriment de la reconstitution lymphocytaire (Beauchemin et al. article en préparation). Comme le mécanisme d'action de la protéine HOXB4 n'est pas encore connu, la raison de ce débalancement est également inconnue.

## **Description et pertinence du projet**

### **5.1 Problématique**

Lors d'une greffe de cellule souche, les traitements de radiothérapie et de chimiothérapie administrés aux patients atteints de leucémie détruisent les cellules malignes présentes chez le sujet leucémique. Par contre, en plus de détruire ces cellules malignes, ces traitements vont aussi détruire les cellules souches hématopoïétiques saines. Afin de palier cet effet secondaire, il est possible d'administrer au patient des cellules souches d'un donneur compatible. Il est aussi possible de prélever les cellules souches d'un sujet leucémique et de les congeler avant de procéder à la chimio-radiothérapie intensive. Malheureusement, suite aux traitements anti-leucémiques intensifs, les cellules souches se retrouvent souvent en quantité insuffisante pour que cette greffe puisse reconstituer pleinement le système sanguin des patients. D'où la nécessité d'expander les cellules souches afin d'avoir suffisamment de CSH pour procéder à l'autogreffe. Tel que décrit précédemment, le facteur de transcription HOXB4 est une protéine intéressante pour l'expansion des cellules. Afin de permettre l'utilisation de cette protéine dans le but de traiter les greffons, il est cependant important de s'assurer qu'elle expand les cellules souches normales et non pas les cellules souches malignes qui pourraient persister chez les sujets avec une leucémie ou une autre condition cancéreuse.

## **5.2 Hypothèses**

Notre première hypothèse de travail est que la protéine HOXB4 favorise préférentiellement l'expansion des cellules souches hématopoïétiques normales et non pas des cellules souches malignes, qui sont moins indifférenciées. Notre deuxième hypothèse est que la surexpression de la protéine dans les cellules de moelle osseuse affecte la différenciation ainsi que la prolifération des cellules lymphoïdes B.

## **5.3 Objectifs de travail**

Nous nous sommes fixés trois objectifs de travail. Premièrement, nous avons voulu évaluer l'effet de la surexpression de la protéine HOXB4 dans un modèle murin de leucémie B. Deuxièmement, nous avons déterminé l'effet de la protéine HOXB4 sur des cellules leucémiques humaines *in vitro*. Troisièmement, nous avons évalué l'effet de la surexpression de HOXB4 sur la différenciation des cellules B ainsi que la fréquence des progéniteurs B pouvant se différencier en cellules B.

## **Matériels et méthodes**



### **6.1 Culture des cellules leucémiques humaines avec TAT-HOXB4**

Les cellules de moelle osseuse de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC) de lymphome non Hodgkinien (LNH) et de leucémie myéloïde aiguë (LMA) ont été décongelées et ensemencées dans des plaques de 6 puits à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules par ml. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours afin de remettre les cellules à leur concentration initiale. Deux milieux de culture distincts ont été utilisés pour la culture liquide : 1) X-Vivo 15 (Lonza (BioWittaker), Basel, Suisse) supplémenté de 300 ng/ml Stem Cell Factor (SCF) (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) et 50 ng/ml G-CSF (Amgen) et 2) X-Vivo 15 (Lonza) supplémenté de 100 ng/ml SCF (Amgen), 100 ng/ml trombopoïétine (TPO) (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), 100 ng/ml FLT3-L (Peprotech) et 20 ng/ml IL-6 (Peprotech). Lors de cette culture, la protéine TAT-HOXB4 est ajoutée à une concentration initiale de 40 nM. Notre culture contrôle ne reçoit pas de protéine TAT-HOXB4. Comme la demi-vie de la protéine TAT-HOXB4 est de 4 heures, 20nM de cette protéine est ajoutée à toutes les 4 heures. Les plaques sont placées dans un incubateur à 37 degrés Celsius avec 5% de CO<sub>2</sub>. La culture liquide est maintenue durant 4 jours. Suite à ces traitements, les cellules leucémiques restantes ont été marquées et analysées en cytométrie de flux. Pour les trois différentes leucémies, nous avons utilisé un anticorps monoclonal conjugué : CD3 et CD5-FITC, pour les LLC et CD19-APC, CD20-FITC et CD80-FITC pour les LNH et CD33 APC et CD13 PE pour les LMA (tous de Becton Dickson (BD), Franklin Lake, NJ, USA). Les cellules sont incubées 30 minutes sur glace en présence de l'anticorps. Par la suite, elles sont lavées avec une solution saline de Hank's (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les cellules sont resuspendues dans du FACS Flow (BD). Les différents fluorochromes couplés aux anticorps sont alors excités par les lasers du cytomètre et ils émettent un signal qui permet de distinguer visuellement les populations négatives des populations positives pour l'anticorps désiré.

### **6.1.1 PCR Multiplex**

La PCR multiplex comporte deux étapes. La première consiste en l'amplification des points de cassures MBR ou MCR externes. La deuxième étape consiste en l'amplification des mêmes points de cassures mais internes avec le produit d'amplification de la première PCR. Il a été démontré que 1,5 ug d'ADN correspondait à 250 000 cellules. Comme nous voulons que le résultat soit exprimé pour 1 000 000 de cellules analysées, nous effectuerons l'analyse sur 4 échantillons de 1,5 ug d'ADN. De plus, un contrôle positif est effectué avec la  $\beta$ -globine afin de s'assurer de la présence de l'ADN. À la fin des deux amplifications, l'ADN est migré dans un gel d'agarose 1,5% suivant les étapes décrites précédemment. Des études antérieures effectuées dans le laboratoire ont démontré qu'il est possible d'obtenir une évaluation semi-quantitative avec des dilutions sériées des échantillons analysés.<sup>167</sup>.

### **6.1.2 PCR semi-quantitative**

La PCR semi-quantitative permet de quantifier la quantité de cellules possédant la translocation t(14;18) plus précisément que la PCR multiplex. Le produit de la première PCR effectuée (PCR multiplex) sera repris et dilué de façon séquentielle. Puis, amplifié par PCR une seconde fois avec des amorces nichées. Le nouveau produit de cette PCR sera migré dans un gel d'agarose 1,5% tel que décrit précédemment. Le nombre de dilutions avec un produit d'amplification

délectable permet de déterminer la fréquence de cellules présentant un réarrangement Bcl-2/IgH.<sup>167</sup>

### **6.1.3 Essai semi-solide**

L'essai semi-solide nous permet de visualiser, après quelques jours de culture dans un environnement semi-solide, les progéniteurs présents qui étaient présent dans notre culture. Lorsque nous effectuons la lecture des cellules, selon la colonie lue, nous pouvons déterminer quel progéniteur était présent lorsque nous avons mis les cellules en culture. Pour ce faire, nous avons utilisé un milieu semi-solide pour cellules humaines (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) au quel nous avons ajouté nos cellules ainsi que de l'IMDM pour ajuster notre concentration cellulaire. Nous avons placé nos culture dans un milieu à 37°Celsius, 5% CO<sub>2</sub> puis après 14 jours, nous avons lu et déterminé les colonies présentes dans notre pètri.

### **6.2 Infection rétrovirale**

L'infection des cellules de moelle osseuse a été réalisée avec la lignée GP+E 86 qui produit des rétrovirus contenant la protéine verte fluorescente (GFP) ou la protéine d'intérêt soit HOXB4 suivie de la GFP. La séquence de notre gène d'intérêt est entourée d'une séquence LTR (*long terminal repeat*) qui est un promoteur fort. Comme la lignée GP+E est une lignée difficile à transfecter, il a fallu utiliser une lignée intermédiaire, les 293GPG (VSV). Cette lignée est caractérisée par la présence de la protéine d'enveloppe G qui lui permet d'avoir un caractère amphotropique, c'est-à-dire qu'elle peut infecter une vaste quantité de cellules de toutes origines, comprenant l'humain. Vu le risque de toxicité chez l'humain, nous avons utilisé ces vecteurs et cellules 293GPG pour infecter une

lignée cellulaire produisant des virus pouvant uniquement pénétrer dans des cellules murines, les GP+E 86.<sup>168;169</sup> Les vecteurs contenant la séquence protéine désirée (i.e. GFP ou HOXB4-GFP) étaient transfectés dans les cellules 293GPG à l'aide de la lipofectamine 2000 (invitrogen).

### **6.3 Modèle murin de leucémie B**

Suite aux expériences réalisées *in vitro*, nous avons voulu développer un modèle de leucémie murine dans lequel nous pourrions surexprimer la protéine HOXB4. Étant donné les résultats antérieurs qui démontraient une diminution des lymphocytes B dans les souris greffées avec des cellules surexprimant HOXB4, nous avons utilisé un modèle murin de leucémie B. Ce modèle avait pour but de déterminer si les cellules leucémiques seraient affectées comme les cellules B normales. Le modèle de souris E2A-PBX1 nous a été gracieusement offert par le Dr Janetta Bijl. Dans cette leucémie, les deux domaines de transactivation d'E2A sont fusionnés avec la portion C terminale de PBX1.<sup>170</sup> Cependant, les cellules possédant cette translocation développent habituellement une leucémie myéloïde.<sup>170-172</sup> Dederer et al.<sup>170;173</sup> ont réussi à obtenir une leucémie lymphoïde en ajoutant le promoteur des chaînes lourdes des immunoglobulines mais les cellules affectées étaient les lymphocytes T. Finalement Bijl et al.<sup>170</sup> ont croisé des souris possédant l'insertion rétrovirale avec des souris possédant un fond génétique CD3<sup>-/-</sup> c'est-à-dire qu'elles ne peuvent pas produire de cellules T matures. Ainsi, l'équipe a réussi à obtenir une leucémie pré-B possédant la translocation t(1:19) Cette leucémie est caractérisée par une très grande infiltration de cellules B, B220 positives dans la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques ainsi que l'absence de CD43 et d'IgM de surface sur ces même cellules B220 positives.

### **6.3.1 Essai de dilution limite**

Afin de procéder à notre essai de dilution limite, nous avons injecté différentes doses de cellules leucémiques (entre 5000 et 15 cellules) provenant d'une moelle de souris transgénique pour E2A-PBX1 dans des souris préalablement irradiées à 600 cGy. Quelques mois suivant la greffe, les souris positives et négatives pour le développement de la leucémie étaient évaluées et nous avons utilisé le logiciel L-calc pour déterminer la fréquence des cellules initiateuses de la leucémie.

### **6.3.2 Détection des cellules leucémiques.**

Les souris présentant des signes de la maladie ont été sacrifiées et les organes prélevés (moelle osseuse et rate). Les organes sont resuspendus dans du milieu Hank's contenant 2% sérum bovin (Invitrogen). Par la suite, les organes ont été marqués avec le B220 APC (Biologend, San Diego, CA. USA), CD43 PE (Biologend) et IgM PE (Invitrogen). Les cellules ont ensuite été analysées en cytométrie de flux.

### **6.3.3 Infection des cellules E2A-PBX1**

Durant la coculture des cellules E2A-PBX1 sur les GP+E86 les cellules E2A-PBX1 sont placées dans un milieu de culture contenant du DMEM (Invitrogen) supplémenté avec 10% sérum (Invitrogen) et 2 ug/ml d'interleukine-7 (R&D Systems, Minneapolis MN, USA). Afin d'aider les virus à pénétrer à l'intérieur des cellules, nous ajoutons 6 ug/ml de polybrène (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), polymère cationique qui annule les charges de répulsion entre le virus et les cellules permettant une meilleure efficacité de l'infection.

## **6.4 Etude de la différenciation des lymphocytes B**

### **6.4.1 Étude de l'ontogénie B**

Afin d'étudier le développement de l'ontogénie B, nous avons réalisé une greffe de moelle osseuse dans un modèle autologue (cellules de souris B6SJL greffées à des souris B6SJL). Les souris donneuses sont injectées avec du 5-fluorouracil (Mayne Pharma, Montréal, QC, Canada), agent chimio thérapeutique qui détruit les cellules en divisions rapides. Ainsi, les cellules matures de la souris sont éliminées créant un espace pour les cellules souches qui entreront en division afin de combler ce vide. Quatre jours post-injection, les souris sont sacrifiées et la moelle osseuse est prélevée et resuspendue dans un milieu de pré-stimulation contenant du DMEM contenant 15% sérum, 10 ng/ml d'IL-6, 10 ng/ml d'IL-3, 100 ng/ml de SFC, 50 ug/ml de gentamicine (Invitrogen) et 10 ug/ml de ciprofloxacine (Hospira, St-Laurent, QC, Canada) durant 48 heures. Les cytokines ont été gracieusement fournies par le laboratoire du Dr. Guy Sauvageau, IRIC). Par la suite, les cellules ont été mises en coculture sur les cellules GP+E86 pendant 48 heures avec 6 ug/ml de polybrène (Sigma). Suite à l'infection, les cellules ont été greffées dans les souris receveuses en deux groupes : les souris contrôles (ayant reçu les cellules GFP+) et les souris ayant reçu les cellules surexprimant la protéine d'intérêt (HOXB4-GFP).

Afin de suivre le développement des différentes lignées du système sanguin dans nos souris receveuses, nous avons prélevé chaque semaine un échantillon de sang dans un tube hépariné (Fisher Ottawa, ON, Canada). L'échantillon subit une lyse des érythrocytes (Chlorure d'ammonium). Par la suite, les cellules sont marquées en utilisant le CD3 PECy-5, le B220 APC et le MAC-1 (CD11b) PECy-7 (tous de Biolegend). Les cellules étaient ensuite détectées par cytométrie de flux.

De façon à pouvoir évaluer la différenciation des cellules B (leur ontogénie), nous avons sacrifié les souris en deux groupes, un à 8 et un autre à 20 semaines post-transplantation. Nous avons prélevé la moelle osseuse, la rate et le thymus et

marqué leurs cellules avec les anticorps CD3, B220 et MAC-1 et analysé les populations en cytométrie de flux. Les cellules de la moelle osseuse et de la rate ont été marquées avec des anticorps nous permettant de visualiser les différentes fractions de l'ontogénie B. Les anticorps utilisés ont été les suivants : B220 Alexa 700 (BD), CD43 APC (Biologend), CD24 PeCy5 (Biologend), BP-1 PE (Biologend) et IgM PeCy7 (eBioscience, San Diego, CA, USA).

#### **6.4.2 Étude de la fréquence des progéniteurs B**

Pour étudier la fréquence des progéniteurs B qui se différencient en lymphocytes B nous avons eu recours à un essai en dilution limite appelé essai de « *Whitlock-Witte* ». Cet essai consiste à ensemencer un certain nombre de cellules en dilution limite sur des cellules stromales S17 qui supportent la différenciation des cellules B.<sup>168;169;174</sup> Les cellules S17 sont cultivées dans un milieu contenant RPMI 10% sérum, 1 mM de sodium pyruvate, 0.1 mM d'acides aminés non essentiels, 10 nM d'HEPES, 10 uM de  $\beta$ -mercaptoéthanol (A&C Ltd., St-Laurent, QC, Canada) et 1% de pénicilline/streptomycine. Environ 4 à 5 jours avant de début de l'essai, les cellules S17 sont mises en culture dans des plaques de 96 puits. Lorsque les cellules S17 ont atteint la confluence, les cellules de la moelle osseuse ont été resuspendues dans le milieu « *Whitlock-Witte* » qui consiste en du RPMI 5% de sérum pour cellules B, 50 uM de  $\beta$ -mercaptoéthanol et 50 ug/ml de gentamycine (Gibco). Les cellules ont été placées dans 12 puits pour chacune des dilutions. Après 21 jours de coculture, les colonies B formées dans les puits ont été comptées sous microscope et avec l'aide du logiciel L-CALC, nous avons pu déterminer la quantité (fréquence) de progéniteurs B dans l'échantillon de moelle au départ. Pour déterminer si la protéine HOXB4 modifiait la fréquence des progéniteurs, nous avons trié les cellules exprimant le marqueur d'intérêt. Suite à la coculture, nous avons établi le décompte des colonies exprimant la GFP en microscopie à fluorescence.

### **6.5 Études des CLP**

Afin de déterminer quel était l'impact de la surexpression de HOXB4 sur les CLP nous avons effectué une greffe uniquement de CLP dans des souris B6SJL et dans des souris immunosupprimées NOD/SCID. Afin de récolter un maximum de CLP, nous avons d'abord greffé un maximum de cellules GFP/HOXB4-GFP à des souris receveuses. Huit semaines post-greffe, les souris sont sacrifiées et la moelle osseuse est récupérée et resuspendue dans du Hank's contenant 5% de sérum de rat. Comme les CLP n'ont pas de marqueur de lignée (lin-), nous avons effectué une déplétion de toutes les cellules matures exprimant les marqueurs de lignée avec un kit d'enrichissement des progéniteurs (Stem Cell Technologies). Suite à cette déplétion, les cellules restantes sont marquées avec les anticorps exprimés par les CLP soit le C-Kit APC (Biolegend), le SCA-1 PeCy5 (eBioscience) et l'IL-7R PE (eBioscience). Les cellules sont ensuite triées sur un appareil de cytométrie de flux (FACS vintage, BD). Les CLP ainsi récupérés sont injectés dans une nouvelle souris receveuse à raison de 10 000 CLP supplémentés de 200 000 cellules de support (moelle osseuse normale). Comme précédemment décrit, un échantillon sanguin est prélevé toutes les semaines et marqué avec le CD3 PeCy5, le B220 APC et le MAC-1 PeCy7. À la 8<sup>ième</sup> post-transplantation, les souris sont sacrifiées. La moelle osseuse et la rate sont prélevées et resuspendues dans du milieu Hank's avec 2% sérum pour ensuite être marquées tel que décrit précédemment.

### **6.6 Études statistiques**

Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel Graphpad Prism 4.0. Nous avons utilisé le test « two-way ANOVA » qui nous permet de comparer la différence entre le traitement avec HOXB4 et sans HOXB4. Ainsi, le logiciel nous donne une valeur de P qui nous permet de déterminer si les résultats sont significatifs. Une valeur de P inférieure à 0,05 a été considérée statistiquement significative. Dépendamment de la valeur de P, un résultat peut être significatif de 3 façons : p inférieur à 0,05 donne une \*, p inférieur à 0,01 donne deux \* et p



inférieur à 0,001 donne trois \*. Quant aux barres d'erreurs, elles représentent les valeurs entre lesquelles sont comprises les différents réplicas. Les expériences présentées ont été effectuées une seule fois mais elles contiennent une grande quantité de souris testées (n= jusqu'à une douzaine).

## **Résultats**

### **7.1 Expansion des cellules leucémiques humaines « in vitro » avec le TAT-HOXB4**

Afin de déterminer si la protéine chimérique TAT-HOXB4 pouvait avoir un pouvoir de prolifération sur les cellules tumorales, nous avons testé son effet sur les cellules de deux patients atteints de lymphome non hodgkinien et deux d'une leucémie lymphoïde chronique. Après avoir décongelé et récupéré les cellules qui furent mises en culture liquide pendant 4 jours sans (contrôle) ou avec la protéine TAT-HOXB4. Nous avons procédé à un marquage avant et après la culture afin de déterminer le phénotype initial et de quantifier les cellules pré et post culture liquide. Dans le cas de LNH, nous avons suivi la population des cellules T (CD3) et des cellules B (CD19, CD19/20). Pour ce qui est de la LLC, nous avons en plus suivi le CD5 qui est reconnu pour être exprimé par les cellules tumorales de LLC.

Dans la première expérience effectuée avec des cellules de LLC (#1), la population de CD3 disparaît presque entièrement avec une perte de 99% avec ou sans HOXB4 (Figure 1A). Sans la présence de la protéine, les lymphocytes B de LLC (CD19+) diminuent de 72% tandis qu'ils diminuent de 75% lorsque le HOXB4 est ajouté (Figure 1B). Les cellules B doublement marquées par le CD19 et le CD20 ont sensiblement le même comportement en diminuant de 72 % sans la protéine et de 70% avec cette dernière (Figure 1C). Finalement les populations de LLC exprimant CD5 et CD19 incubées sans ou avec la protéine HOXB4 diminuent de 70% et 77% respectivement (Figure 1D).

La deuxième expérience avec des cellules d'un sujet atteint de LLC (#2) nous a permis de déterminer que la population CD3+ diminue de 80% dans le contrôle et

de 75% en présence de HOXB4 (Figure 1E). Quant aux lymphocytes B (cellules de LLC), nous observons une perte de 46% en absence de TAT-HOXB4 et de 40% en sa présence (Figure 1F). La population des cellules B doublement marquées (CD19+CD20+) chute moins en absence qu'en présence de la protéine (Figure 1G). Finalement, la population CD5+CD19+ perd 46% de leurs cellules dans le contrôle et 39% lorsque le HOXB4 est présent (Figure 1H). Globalement, nous n'avons donc pas observé de différence significative dans la croissance de cellules de LLC en présence ou absence de la protéine recombinante TAT-HOXB4.

Lorsque nous comparons les différentes populations de la LNH #1, nous pouvons remarquer, autant sans ou avec le TAT-HOXB4 qu'il y a une grande diminution des lymphocytes T et des lymphocytes B après 4 jours de culture liquide dans du milieu supplémenté de 300 ng/ml SCF et 50 ng/ml G-CSF. Sans la protéine, les cellules T sont diminuées d'environ 70% et avec la protéine, elles ont diminuées d'environ 78%.(Figure 2A) Les cellules B quant à elles sont diminuées de 85% sans le TAT-HOXB4 et de 75% en présence de cette dernière (Figure 2B). Si on regarde les cellules B doublement marquées (CD19+CD20+), nous pouvons remarquer qu'initialement il y a très peu de cellules B et que suite à la culture, la protéine TAT-HOXB4 amène un peu moins de croissance de la population CD19+CD20+ face au contrôle sans TAT-HOXB4.

(Figure 2C).

Nous avons effectué une deuxième expérience avec un patient atteint de LNH (#2) que nous avons mis en culture liquide dans deux milieux différents. Un premier milieu (milieu 1) enrichi avec de l'interleukine-6, la thrombopoïétine, le SCF et le FLT3-L et le deuxième milieu (milieu 2) contenant du SCF et du G-CSF (qui est le même milieu qui a été utilisé pour les cellules du patients #1). Dans les deux milieux, nous pouvons observer une chute pratiquement totale des lymphocytes T avec et sans TAT-HOXB4 dans le milieu. (Figure 2 D et G) Lors de la culture avec le premier milieu, nous avons observé une chute des cellules B CD19+ de 62% sans la protéine et de 64% avec cette dernière (Figure 2E). La culture avec le deuxième milieu nous révèle une chute de 75% des cellules B avec et de 76% sans TAT-HOXB4 (Figure 2H). La population doublement marquée (CD19+CD20+), elle est diminuée dans les deux milieux et les deux conditions soit avec ou sans TAT-HOXB4. Elle chute de 91% dans le premier milieu et de 89% dans le deuxième lorsque le TAT-HOXB4 n'est pas ajouté à la culture alors que lorsque nous l'ajoutons, la population diminue de 85% dans le milieu #1 et de 94% dans le milieu #2 (Figure 2F et I)

Dans le cas des cellules de LNH #2, nous avons pu effectuer des réactions de PCR afin de déterminer si nous avions une expansion des cellules tumorales puisque ces cellules présentaient la translocation t(14:18) typique des lymphomes non Hodgkinien. Nous avons donc effectué une PCR multiplex et une PCR semi-quantitative afin de déterminer la quantité de cellules possédant la t(14;18). Les figures 3A et 3B nous montrent qu'il y a 4 bandes positives pour les cellules

fraîches, les cellules contrôle et les cellules cultivées avec la protéine TAT-HOXB4 du milieu 1 et du milieu 2, correspondant à plus de 5 cellules transloquées par million de cellules. Afin d'obtenir une mesure plus précise, nous avons réalisé une analyse par PCR semi-quantitatif. La figure 3C nous montre qu'il y a 4 dilutions positives sur 6 pour les cellules fraîches et les cellules contrôles mises en culture dans le milieu 1 signifiant 0.05% d'infiltration par des cellules tumorales. Les figures 3D et 3E, correspondant aux cellules traitées avec TAT-HOXB4 ont démontré des résultats semblables (0.05%) dans les deux milieux étudiés, confirmant l'absence d'induction de la croissance lymphomateuse par HOXB4.

Comme le HOXB4 ne semblait avoir aucun effet sur les cellules leucémique B, nous avons voulu voir s'il en serait de même avec des cellules de leucémie myéloïde. Cette question était particulièrement importante car, nous savions que HOXB4 favorisait la croissance de la lignée myéloïde. Dans les deux cas étudiés, c'est-à-dire les patients #1 et 2, les cellules T ont chuté de plus de 90% avec ou sans la présence de TAT-HOXB4 (Figure 4 A et E). Suite à la culture, les cellules leucémiques du patient #1 marquées au CD33 diminuent de 96% dans les deux conditions (Figure 4 B). De même, les cellules CD33+ du patients #2 chutent de plus de 90% avec ou sans TAT-HOXB4 (Figure 4F). Finalement, 96% des cellules CD33/CD13 positives du patient #1 sont perdues avec ou sans le TAT-HOXB4 (Figure 4C) et celles du patients #2 baissent de plus de 90% en présence ou non de TAT-HOXB4 (Figure 4F). Nous avons par la suite effectué un essai en

milieu semi-solide avec les cellules du patient #1, et les résultats obtenus nous indiquent que même en présence de HOXB4, nous n'avons pas d'expansion des progéniteurs myéloïdes CFU-GM (*Colony forming unit-Granulocyte/Macrophage*).

## **7.2 Expansion des cellules E2A-PBX1 « in vivo » surexprimant la protéine HOXB4**

Avant de pouvoir évaluer l'effet de surexpression de la protéine sur notre modèle leucémique murin, il fallait d'abord déterminer la fréquence des cellules initiatrices de la leucémie. Pour ce faire, nous avons effectué une série de dilutions limites avec les cellules E2A-PBX1 ne surexprimant ni GFP (contrôle positif) ni HOXB4. Ainsi, nous avons injecté 6 groupes de souris avec 6 différentes doses de cellules : 5000, 1000, 500, 150, 30 et 15 cellules (provenant de la moelle osseuse d'une souris atteinte de leucémie). Les souris ayant reçu les plus hautes doses de cellules sont mortes dans les premières trois semaines suivant la greffe et celles ayant reçu des doses intermédiaires ont mis quelques semaines de plus. Les souris ayant été greffées avec les plus petites quantités de cellules n'ont jamais développé la maladie et ont été sacrifiées 4 mois suivant la greffe. Le phénotype des souris ayant développé la leucémie a été déterminé afin de confirmer l'infiltration de cellules leucémiques dans les différents organes. Comme la translocation E2A-PBX1 entraîne le développement d'une leucémie pré-B, la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques inguinaux ont été marqués avec le B220, anticorps exprimé par les cellules B, peu importe son stade

de développement. Par la suite, nous avons pu confirmer que les cellules étaient bien des cellules pré-B en marquant avec l'anticorps anti-CD43 et anti-IgM puisque les cellules pré-B n'expriment pas ces marqueurs de surface. Nous avons donc pu établir que les souris sacrifiées avaient réellement développé la leucémie vu la présence de cellules B dans les trois organes prélevés et l'absence d'expression de CD43 et d'IgM de surface. (Figures 5A). Par la suite, nous avons pu déterminer la fréquence des cellules leucémiques qui avaient la capacité d'induire la maladie chez la souris. Cette fréquence est de 1 sur 247 cellules tel qu'illustré dans la Figure 5B. Suite à cette expérience, nous avons voulu infecter les cellules E2A-PBX1 afin qu'elles surexpriment soit la GFP, qui sert de contrôle, ou le HOXB4-GFP, notre protéine d'intérêt afin de déterminer si la surexpression de la protéine HOXB4 entraînait une modification de la fréquence des cellules initiatrices de la leucémie. Afin de procéder à cette infection, nous avons co-cultivé les cellules E2A-PBX1 dans un milieu favorable aux cellules B sur les cellules productrices de virus. Après deux jours de co-culture, nous pouvons visualiser, en cytométrie de flux, les cellules ayant incorporé les virus grâce à l'expression de la GFP. Cependant, seulement un très faible pourcentage de cellules émettait le signal de la GFP (moins de 1%, Figure 5C). Malgré l'addition de FLT-3 ligand à notre culture, une cytokine favorisant la culture de cellules B, il nous a été impossible d'obtenir une infection satisfaisante. Par la suite, nous avons utilisé un milieu rapporté par Kondo et al.<sup>175</sup> pour infecter des CLP. Ce milieu contient de l'IMDM supplémenté de 10% sérum, 50  $\mu$ M  $\beta$ -



mercaptoéthanol, 20 ng/ml SCF, 10 ng/ml IL-7 et 20 ng/ml FLT-3 ligand. Une fois de plus, nous n'avons pas observé d'infection significative.

À ce moment, nous avons émis l'hypothèse que nos cellules E2A-PBX1 ne proliféraient pas suffisamment pour permettre l'infection. Cependant, un test de prolifération au CFSE, (carboxyfluoresceine succinimidyl ester) nous a permis de visualiser les divisions cellulaires de nos cellules E2A-PBX1 en culture en cytométrie de flux. Comme nos cellules proliféraient et auraient théoriquement dû permettre l'incorporation des virus, ce que nous n'avons pas observé, nous avons décidé de laisser cette approche de côté. Nous avons plutôt opté pour une culture liquide des cellules E2A-PBX1 avec la protéine soluble, le TAT-HOXB4. Suite à une culture de 4 jours avec la protéine soluble ajoutée aux 4 heures, nous avons greffé différents groupes de souris en dilution limite. Pour chacun des groupes (contrôle et TAT-HOXB4) nous avons injecté plusieurs doses de cellules : entre 1 et 10 000 cellules. Nous anticipions que les souris greffées avec les plus grandes quantités de cellules développent la leucémie dans les trois premières semaines et que les doses intermédiaires suivent de près. Malheureusement, il a fallu attendre plusieurs semaines avant qu'une première souris développe la maladie et seulement 2 souris sur 4 sont mortes de leucémie dans le groupe avec la plus haute concentration cellulaire et ce, autant dans le groupe contrôle et le groupe HOXB4. Ces souris ont été phénotypées pour confirmer l'infiltration de cellules leucémiques dans les différents organes. Malheureusement, ces taux de mortalité étaient insuffisants pour permettre de déterminer la fréquence des cellules initiatrices de la leucémie.

### **7.3 Effet de la surexpression de la protéine HOXB4 sur les lymphocytes B normaux.**

Dans les expériences effectuées auparavant dans notre laboratoire, il a été démontré que les souris greffées avec des cellules de moelle osseuse surexprimant la protéine HOXB4 présentaient une diminution de la fréquence de cellules de la lignée lymphoïde et une augmentation considérable du compartiment myéloïde. Nous avons donc voulu déterminer la cause de ce débalancement. Pour ce faire, nous avons recréé les expériences faites antérieurement en greffant deux groupes de souris : des souris recevant 10 000 cellules HOXB4 positives supplémentées de 190 000 cellules de moelle osseuse de support et 50 000 cellules positives supplémentées avec 150 000 cellules de moelle osseuse normale. Les cellules dites positives sont les cellules qui surexpriment le contrôle GFP ou les cellules surexprimant la protéine HOXB4 couplée à la GFP. Dès la quatrième semaine post-transplantation, et ce jusqu'à la 20<sup>ème</sup> semaine post-transplantation, les cellules lymphoïdes B étaient en quantité moindre dans le groupe HOXB4 dans le sang des souris injectées avec les 10 000 cellules positives. De plus, les cellules myéloïdes étaient grandement augmentées en nombre. Les lymphocytes T étaient également diminués dans le groupe HOXB4, de façon significative à la semaine 8 (Figure 6 A, B, C et D). Dans les organes de ces mêmes souris, à la 8<sup>ème</sup> semaine post-transplantation, nous avons noté une diminution des lymphocytes T dans la rate du groupe HOXB4. Les lymphocytes B étaient diminués dans les organes des souris du groupe HOXB4 sauf dans la rate où ils sont augmentés par rapport au groupe GFP. Cependant, ces différences ne sont pas significatives. Pour ce qui est

de la lignée myéloïde, elle était augmentée uniquement dans la moelle osseuse du groupe HOXB4 (Figure 6 E, F et G). À la 20<sup>ième</sup> semaine post-transplantation, nous avons observé une diminution des lymphocytes T dans le groupe HOXB4 dans le thymus. Dans la rate, les cellules B et myéloïdes étaient en quantité égale dans les deux groupes. Dans la moelle osseuse, nous avons observé une augmentation de cellules myéloïdes à 8 et 20 semaines dans la moelle osseuse et une diminution de lymphocytes B uniquement à 20 semaines dans le groupe HOXB4 (Figure 6 H, I et J). Dans le groupe ayant reçu 50 000 cellules, ce fut un peu plus long avant d'identifier une différence entre les lignées dans le sang. À la 4<sup>ième</sup> et la 8<sup>ième</sup> semaine post-transplantation, nous n'avons pas observé d'augmentation des cellules myéloïdes dans le sang (Figure 7A et B). Toutefois, les cellules myéloïdes étaient en plus grand nombre que les cellules lymphoïdes (B et T). C'est à la 12<sup>ième</sup> semaine post-transplantation que la tendance dans le sang s'est inversée. À partir de ce moment, nous avons noté une augmentation des cellules myéloïdes (Figure 7CD). Dans les organes récoltés à la 8<sup>ième</sup> semaine, il y avait un peu plus de cellules B dans le groupe GFP que dans le groupe HOXB4. Les lymphocytes T étaient en quantité équivalente dans les deux groupes (Figure 7E, F et G). À la 20<sup>ième</sup> semaine post-transplantation, il n'y a que dans la rate que nous avons pu observer une diminution des lymphocytes T. Dans la moelle osseuse, il n'y avait pas de différence entre le groupe GFP et le groupe HOXB4 même si les cellules myéloïdes étaient en plus grande quantité que les cellules B. Dans le thymus, il n'y avait pas de différence entre les cellules T présentes dans les deux groupes (Figure 7 H, I et J).

Nous avons ensuite évalué l'ontogénie des cellules B en déterminant les fractions décrites par Hardy.<sup>77</sup> De la cellule la moins mature jusqu'à la cellule B pleinement mature, on compte 6 fractions de A à F et nous en avons quantifié 5 puisque nous n'avions pas suffisamment de fluorochromes différents pour quantifier la fraction F. Dans le groupe injecté avec 10 000 cellules positives, l'évaluation de l'ontogénie B à la semaine 8 dans la moelle osseuse a démontré une fraction B significativement augmentée dans le groupe HOXB4. Dans la rate, l'ontogénie demeure inchangée sauf pour la fraction E qui est augmentée dans le groupe HOXB4 (Figure 6 K et L). À la 20<sup>ième</sup> semaine, nous avons observé dans la moelle osseuse une augmentation de la fraction B dans le groupe HOXB4 ainsi qu'une diminution significative de la fraction E (Figure 6 M et N). Dans le groupe injecté avec 50 000 cellules, à la 8<sup>ième</sup> semaine post transplantation, nous n'avons noté aucune différence majeure dans le processus d'ontogénie. Nous avons observé une minime augmentation de la fraction E (cellules B immatures circulantes) dans la rate (Figure 7K et L). Par contre, à la 20<sup>ième</sup> semaine, la moelle osseuse démontrait une augmentation de la fraction D et une diminution de la fraction E dans le groupe HOXB4. Dans la rate, il n'y avait qu'une légère augmentation de la fraction E dans le groupe HOXB4 alors que toutes les fractions précédentes étaient restées inchangées (Figure 7 M et N).

#### **7.4 Évaluation de la fréquence des progéniteurs B qui se différencient en cellules B**

Suite à l'évaluation de l'ontogénie, nous avons voulu savoir si la prolifération des cellules B était également affectée par la surexpression de HOXB4. Pour ce faire, nous avons choisi d'effectuer un essai en dilution limite « *in vitro* » (Whitlock-Witte). Nous avons d'abord effectué l'essai avec un échantillon de moelle osseuse normale afin de déterminer l'efficacité de notre essai. La fréquence des progéniteurs B était de 1 sur 3370. Nos données étaient donc conformes aux données de la littérature qui identifient une fréquence de progéniteurs B de 1 sur 5000. Par la suite, nous avons déterminé ces fréquences pour des cellules surexprimant GFP, HOXB4-GFP ou ayant été infectées avec un virus vide (co-cultivées sur des GP+E naïves). Le groupe de cellules ayant reçu des virus vides démontrait une fréquence moyenne de 1 cellule sur 5645 qui est devenue une cellule B. Le groupe surexprimant la GFP avait une fréquence moyenne de 1 progéniteur B sur 4886 cellules. Finalement, dans le groupe HOXB4, nous avons obtenu des fréquences de 1 sur 207 750, 1 sur 97 605 et 1 sur 164 830 pour une moyenne de un progéniteur B sur 156 728 (Figure 8A). Ensuite, nous avons déterminé la fréquence de ces progéniteurs provenant de souris greffées avec des cellules de moelle osseuse GFP+ ou HOXB4+. Au jour 0, la fréquence du groupe GFP était de 1 progéniteur B sur 20 000 et celle du groupe HOXB4 était de 1 progéniteur B sur 127 000. Lorsque nous avons sacrifié les souris à la 8<sup>ième</sup> et 20<sup>ième</sup> semaine, nous avons effectué la même expérience à partir de cellules triées, donc encore une fois 100% infectées. À la 8<sup>ième</sup> semaine, la fréquence dans le groupe GFP était de 1 progéniteur B sur 35 000 et de 1 sur 40 000 à la 20<sup>ième</sup>

semaine post-transplantation. Dans le groupe HOXB4, à la 8<sup>ième</sup> et la 20<sup>ième</sup> semaine, aucune colonie B n'a été retrouvée, ce qui indiquait une fréquence de zéro (Figure 8B).

### **7.5 Études des CLP**

Nous voulions non seulement déterminer l'effet de HOXB4 sur les lymphocytes B mais aussi sur les progéniteurs immédiats de ceux-ci, les CLP. Pour ce faire, nous avons infecté de la moelle osseuse murine pour ensuite trier la fraction des CLP. Les CLP triés étaient injectés dans des souris receveuses à raison de 10 000 CLP supplémentées de 200 000 cellules de moelle osseuse normale. Les premières expériences effectuées n'ont pas été concluantes puisque les cellules injectées ne se développaient pas dans le système du receveur (expression de GFP inférieure à 1% en cytométrie de flux) et ce, pour les deux groupes (GFP et HOXB4-GFP).

Nous avons finalement opté pour un nouveau modèle murin pour l'injection de nos CLP. Les receveuses syngéniques ont été remplacées par des souris NOD/SCID. Ces souris sont immunodéficientes et athymiques et elles ne produisent pas de lymphocytes. La figure 9 décrit la stratégie de tri que nous avons utilisée pour isoler des populations pures de CLP. Comme les cellules devaient exprimer soit la GFP ou notre protéine HOXB4, nous avons d'abord délimité la population GFP ou HOXB4-GFP positive. Puis, tel que décrit plus

haut, nous avons sélectionné la population positive pour le récepteur de l'IL-7. Finalement, après avoir cerné les populations GFP et IL-7R positives, nous avons délimité notre population d'intérêt qui exprimait faiblement les marqueurs C-Kit et Sca-1. La première expérience dans ce modèle murin n'a pas permis de récupérer un nombre important de CLP et nous n'avons pu injecter qu'une souris GFP et 2 HOXB4. Dès la deuxième semaine suivant la transplantation, il était possible d'observer des cellules portant le vecteur GFP dans le sang périphérique des souris greffées. Le sang des souris ayant reçu le contrôle GFP était majoritairement GFP positif (80%) alors que les souris ayant reçu les cellules HOXB4-GFP présentaient moins de 20% de cellules HOXB4-GFP positives dans leur sang. Contrairement à nos attentes, la grande majorité de nos cellules GFP positives exprimaient à leur surface le marqueur MAC-1, caractéristique de la lignée myéloïde. À la 8<sup>ème</sup> semaine, les cellules injectées préalablement dans la souris avaient proliféré mais s'étaient différenciées en cellules myéloïdes et non pas en cellules lymphoïdes. Nous avons donc décidé de répéter l'expérience et cette fois, nous avons réussi à injecter un nombre plus important de souris. Le suivi des différentes lignées dans le sang nous a permis de constater que les cellules injectées portant le marqueur GFP s'étaient, encore une fois, différenciées en cellules myéloïdes. Quant aux cellules HOXB4-GFP positives, elles se sont d'abord différenciées majoritairement en cellules de la lignée lymphoïde à 2 semaines post-greffe et quelque peu dans la lignée myéloïde (Figure 10A). Par contre, la proportion de cellules B a diminué dès la semaine 4 et continué à s'atrophier à la semaine 8 (Figure 10 BC). Les proportions de cellules myéloïdes

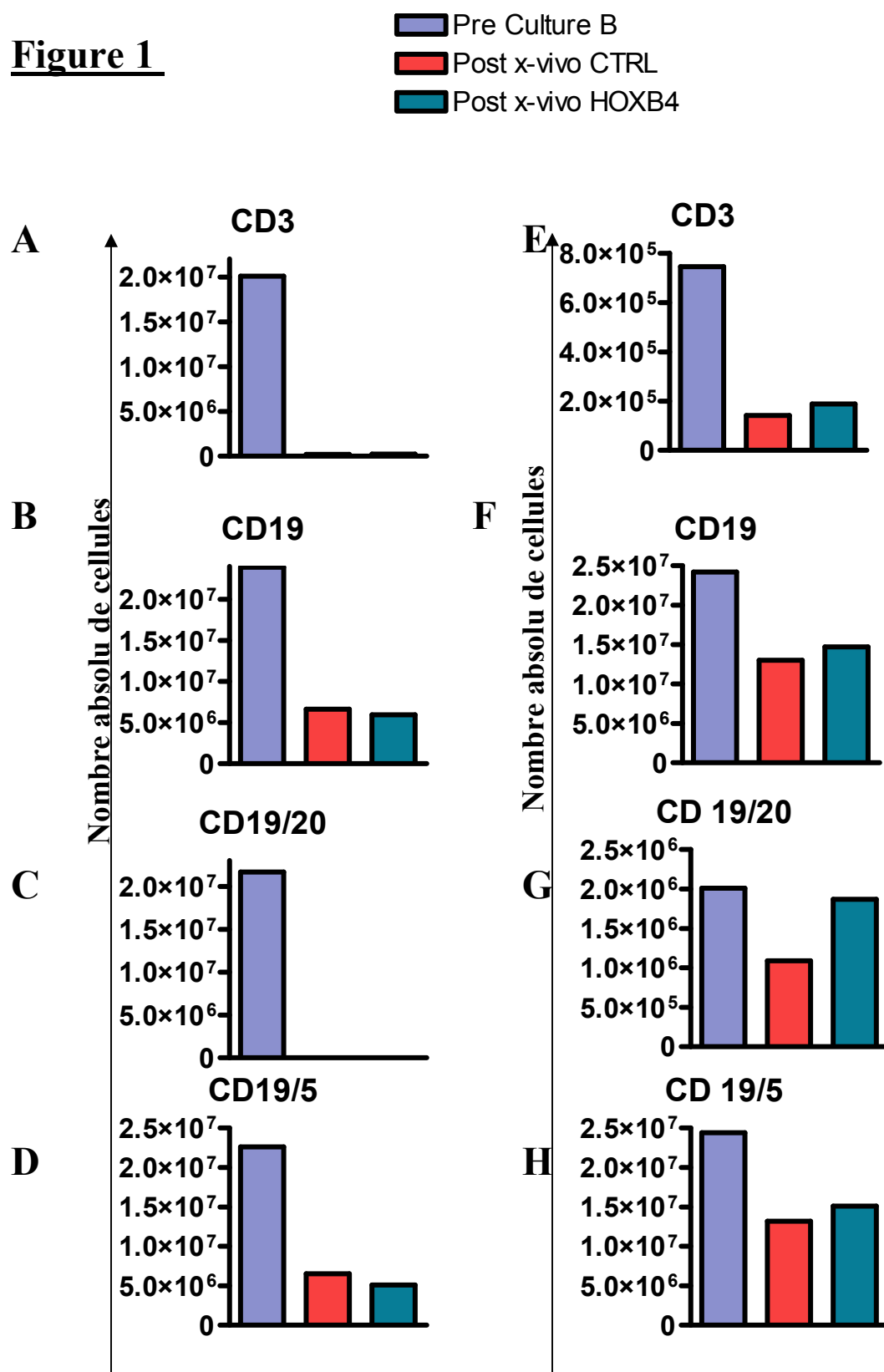
et lymphoïdes T sont restées relativement stables. Il est cependant notable que les cellules HOXB4-GFP positives étaient présentes en nombre diminué dès la semaine 2 au niveau du sang en regard des cellules GFP+ (Figure 10D). De plus, le nombre de cellules HOXB4-GFP a diminué graduellement au cours des 8 semaines d'observation. Au contraire, le nombre de cellules issues des cellules triées portant les marqueurs des CLP n'exprimant pas HOXB4 a augmenté au cours de la même période. Dans la moelle osseuse à 8 semaines post-greffe, nous avons principalement retrouvé des cellules myéloïdes dans les deux groupes GFP et HOXB4 (Figure 10E). Néanmoins, une faible partie des cellules exprimant la GFP ou le HOXB4 ne sont ni lymphoïdes, ni myéloïdes et pourrait être intéressant de déterminer la nature et le comportement de ces cellules.



## **Figures**

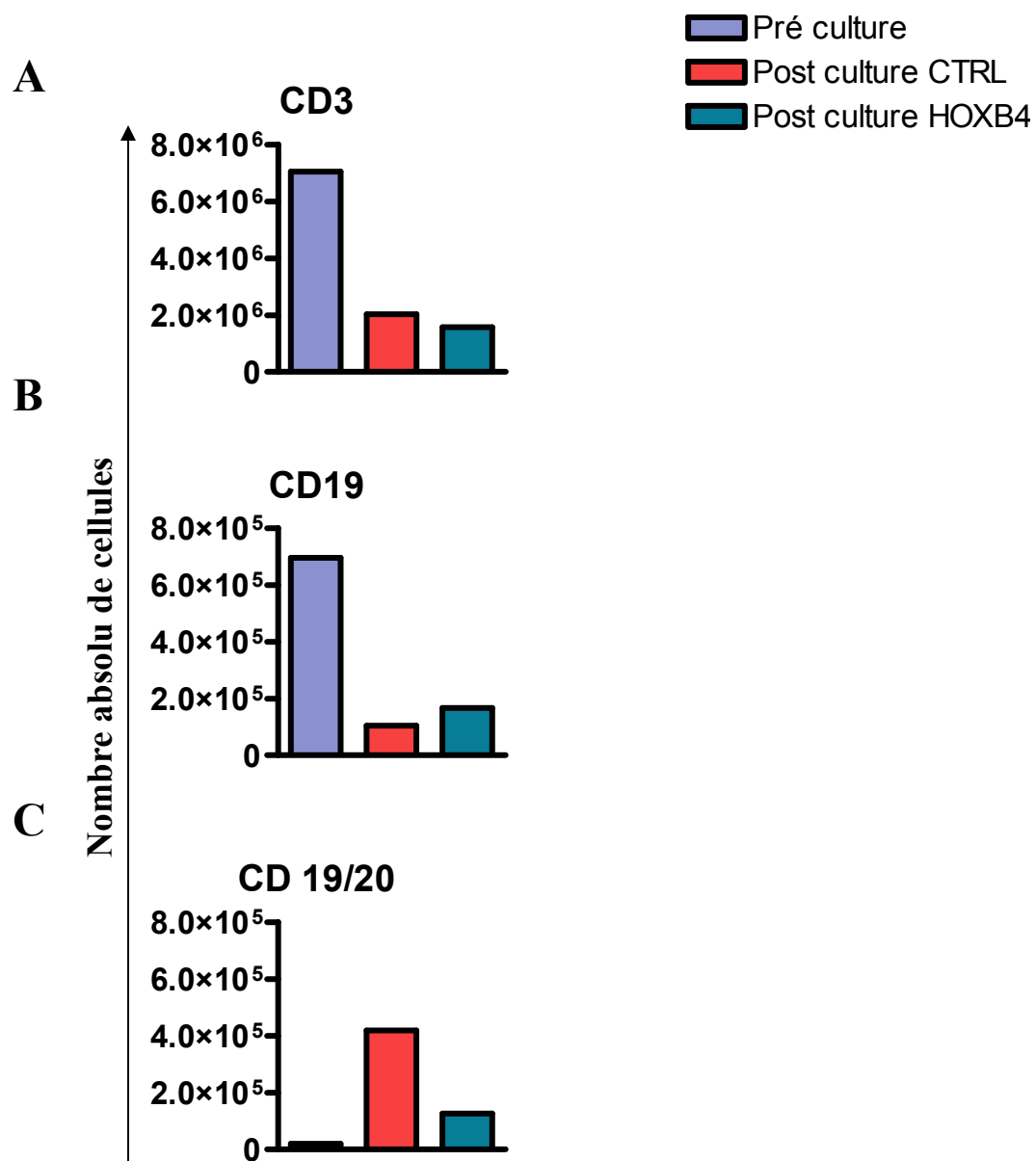
**Figure 1 : Effet de HOXB4 sur les cellules B et T normales et la population B leucémique d'une LLC**

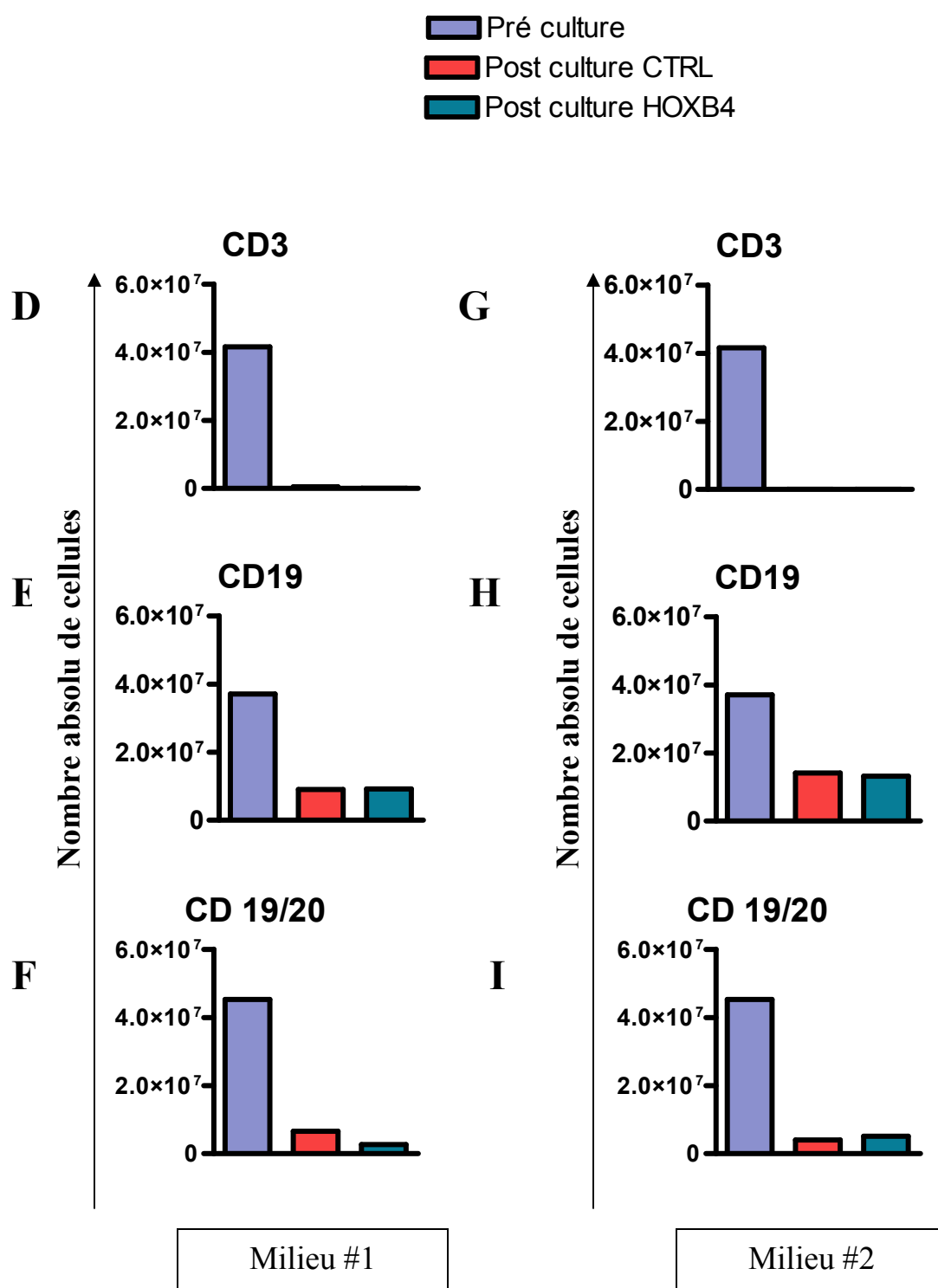
Évaluation par cytométrie de flux de la population de cellules B et T normales et de la population leucémique B de cellules LLC provenant de deux patients différents avant et après traitement avec la protéine TAT-HOXB4. Les figures 1A à 1D représentent la LLC #1 et les figures 1E à 1H représentent la LLC #2. En A et E, nous observons une diminution des cellules T, marquées par le CD3, suite à la culture et ce avec ou sans la protéine HOXB4. En B, C, F et G la population B normale marquée avec le CD 19 et CD 19/20, après les 4 jours de culture diminuait autant avec et sans la protéine HOXB4. Finalement, en D et H la population leucémique CD19+CD5+ diminuait suite à la culture avec et sans HOXB4.

**Figure 1**

**Figure 2: Effet de HOXB4 sur la population T normale et la population lymphomateuse B d'une LNH**

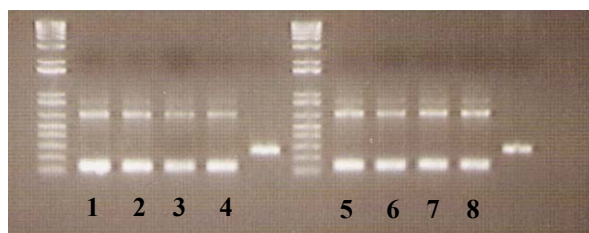
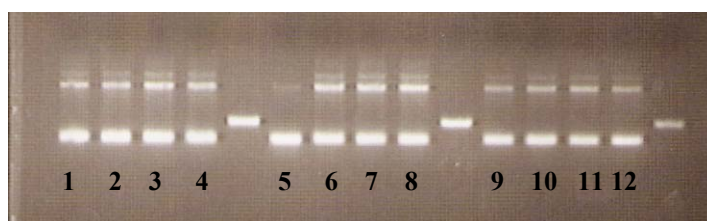
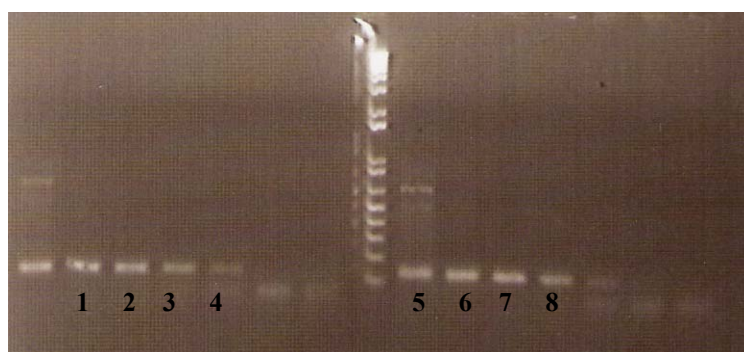
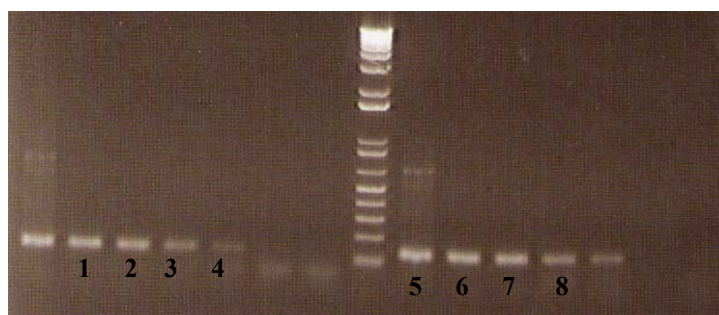
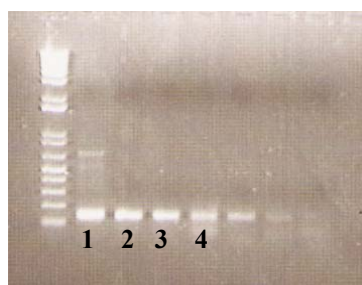
Evaluation en cytométrie de flux de la population leucémique B de deux patients atteints de LNH. La figure 2A représente la population T du patient avec LNH #1 alors que les figures 2B et 2C représentent les populations lymphomateuses B marquées par CD19 et CD19/20. Quant aux cellules de LNH #2, elles ont été cultivées dans deux milieux différents. Les figures 2D et 2G représentent les lymphocytes T du milieu 1 et 2 respectivement. Les figures 2E et 2H montrent la population CD19<sup>+</sup> dans les milieux 1 et 2, et les figures 2F et I représentent la population B CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> également dans les milieux 1 et 2 respectivement.

**Figure 2**

**Figure 2**

**Figure 3 : Effet de HOXB4 sur la population B lymphomateuse.**

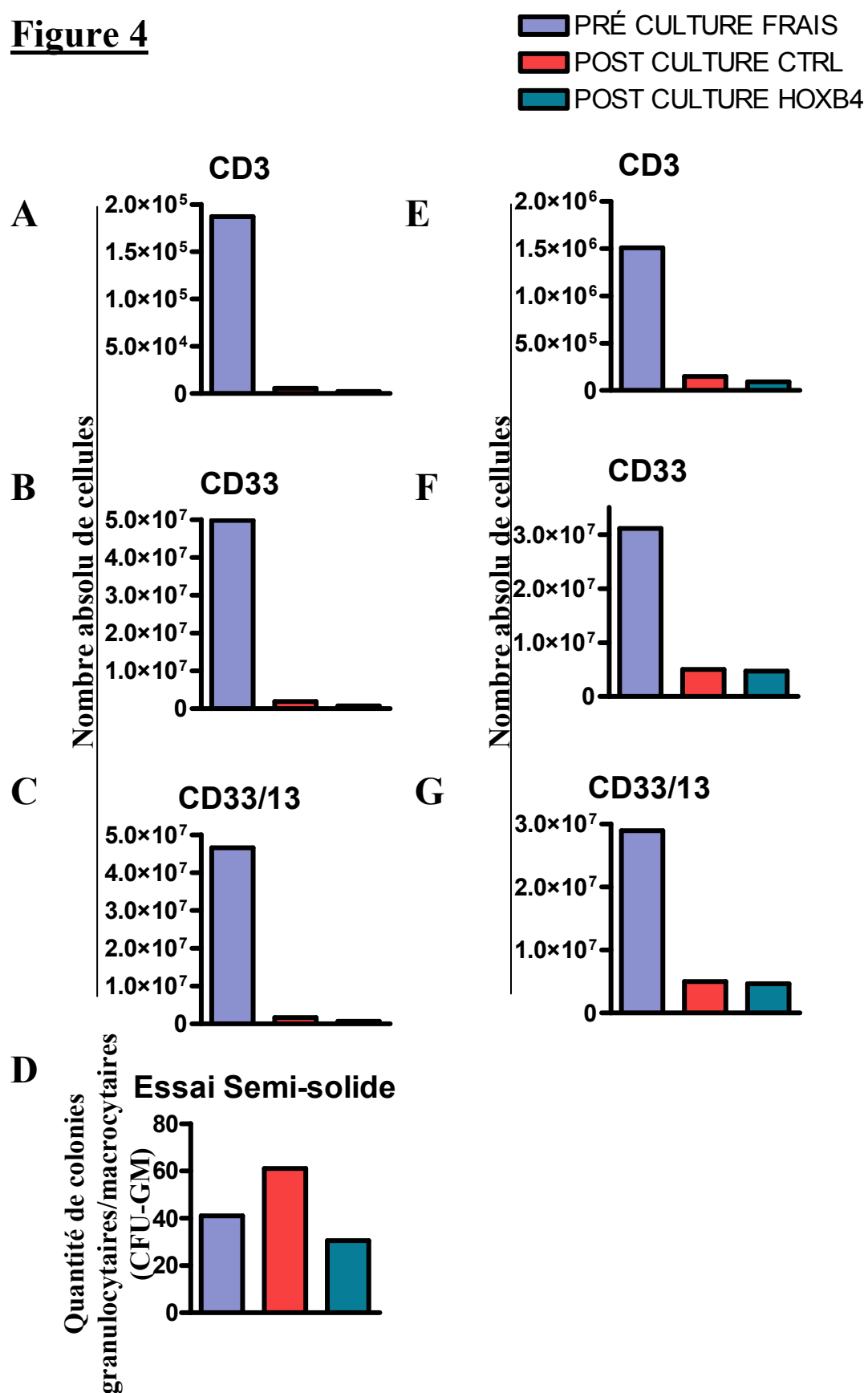
Notre échantillon LNH #2 possédait la translocation t(14;18) ce qui nous a permis de quantifier les cellules possédant cette translocation par PCR. Les résultats de la PCR multiplex sont représentés dans les figures 3A et 3B alors que les résultats de la PCR semi quantitative sont représentés dans les figures 3C, 3D et 3E. Dans la figure 3A, les numéros 1-4, à gauche, les bandes correspondent à des cellules présentant une translocation t(14;18) à un niveau de plus de 5 cellules réarrangées sur 1 million de cellules totales. A droite, (numéros 5-8), les cellules contrôles mises en culture dans le milieu 1 démontrent que ces cellules ayant la translocation t(14;18) sont aussi détectables à plus de 5 cellules réarrangées sur 1 millions de cellules totales. La figure 3B, les numéros 1-4, à gauche, montre les cellules dans le milieu 1 traitées avec la protéine HOXB4 qui ont également plus de 5 cellules possédant la t(14;18) sur 1 000 000. Au milieu (numéros 5-8) et à droite (numéros 9-12), les cellules ont été cultivées dans le milieu 2 respectivement sans et avec la protéine HOXB4. Dans les deux cas, plus de 5 cellules sur 1 000 000 ont la translocation. À gauche (numéros 1-4), la figure 3C indique une bande pour les 4 premières dilutions correspond à 0,05% d'infiltration de la translocation. À droite (numéros 5-8), les cellules contrôle dans le milieu 1 possèdent également 0,05 % de cellules ayant la t(14;18). En 3D, à gauche (numéros 1-4), 0,05% des cellules cultivées dans le milieu 1 avec la protéine HOXB4 sont infiltrées par la translocation et le même nombre est retrouvé à droite pour les cellules contrôles dans le milieu 2 (numéros 5-8). Finalement, la figure 3<sup>E</sup> (numéros 1-4) représente les cellules dans le milieu 2 avec HOXB4 qui ont aussi 0,05% d'infiltration de la t(14;18).

**Figure 3****A****B****C****D****E**



**Figure 4 : Effet de HOXB4 sur une population myéloïde d'une LMA**

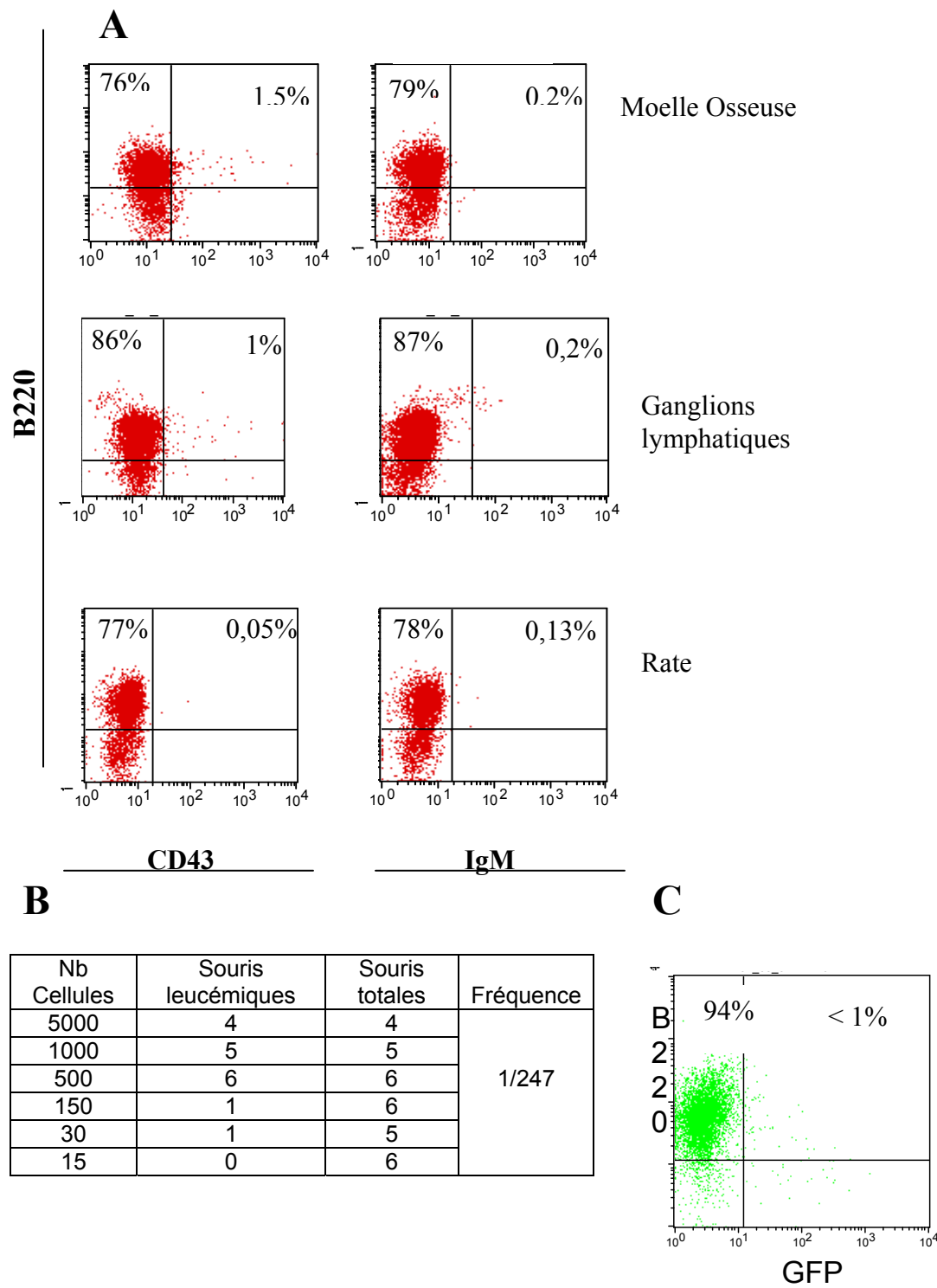
Analyse par cytométrie de flux des populations myéloïde et T de cellules de deux patients avec une LMA avant et après traitement avec la protéine HOXB4. Les figures 4A à 4C représentent la LMA #1 et les figures 4E à 4G représentent la LMA #2. En A et E, nous observons une diminution des cellules T CD3+ suite à la culture et ce avec ou sans la protéine HOXB4. En B, C, F et G la population myéloïde marquée CD33+ et CD33+CD13+ diminue de façon importante après 4 jours de culture avec et sans la protéine HOXB4. Finalement, avec les cellules de la LMA #1 nous avons pu réaliser un essai semi-solide qui nous a permis de confirmer qu'après une culture de 4 jours en présence de HOXB4, nous n'observons pas plus de colonies granulocytaire/myélocytaire (CFU-GM) que lorsque la protéine est absente.

**Figure 4**

**Figure 5 Effet de la protéine HOXB4 sur des cellules leucémiques E2A-PBX1 murines**

La figure A nous démontre la capacité des cellules E2A-PBX1 à induire une leucémie chez la souris. La moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et la rate des animaux qui développaient la maladie étaient en grande majorité infiltrés de cellules B (B220+) qui n'exprimaient ni le CD43 ni l'IgM de surface. En injectant des cellules E2A-PBX1 en dilution limite dans les souris, nous avons pu déterminer la fréquence des cellules E2A-PBX1 pouvant induire la leucémie. Le résultat est rapporté dans la figure B. Après avoir déterminé cette fréquence, nous avons voulu déterminer si la protéine HOXB4 avait la capacité de modifier cette fréquence. Nous avons donc cherché à induire la surexpression de la protéine HOXB4 dans les cellules E2A-PBX1. La figure C démontre que nous n'avons pas réussi à infecter efficacement ces cellules puisqu'elles n'exprimaient pas la GFP. Nous pouvons néanmoins constater que la majeure partie de la population demeure lymphoïde B, ce qui suggère que les cellules E2A-PBX1 survivent à la culture.

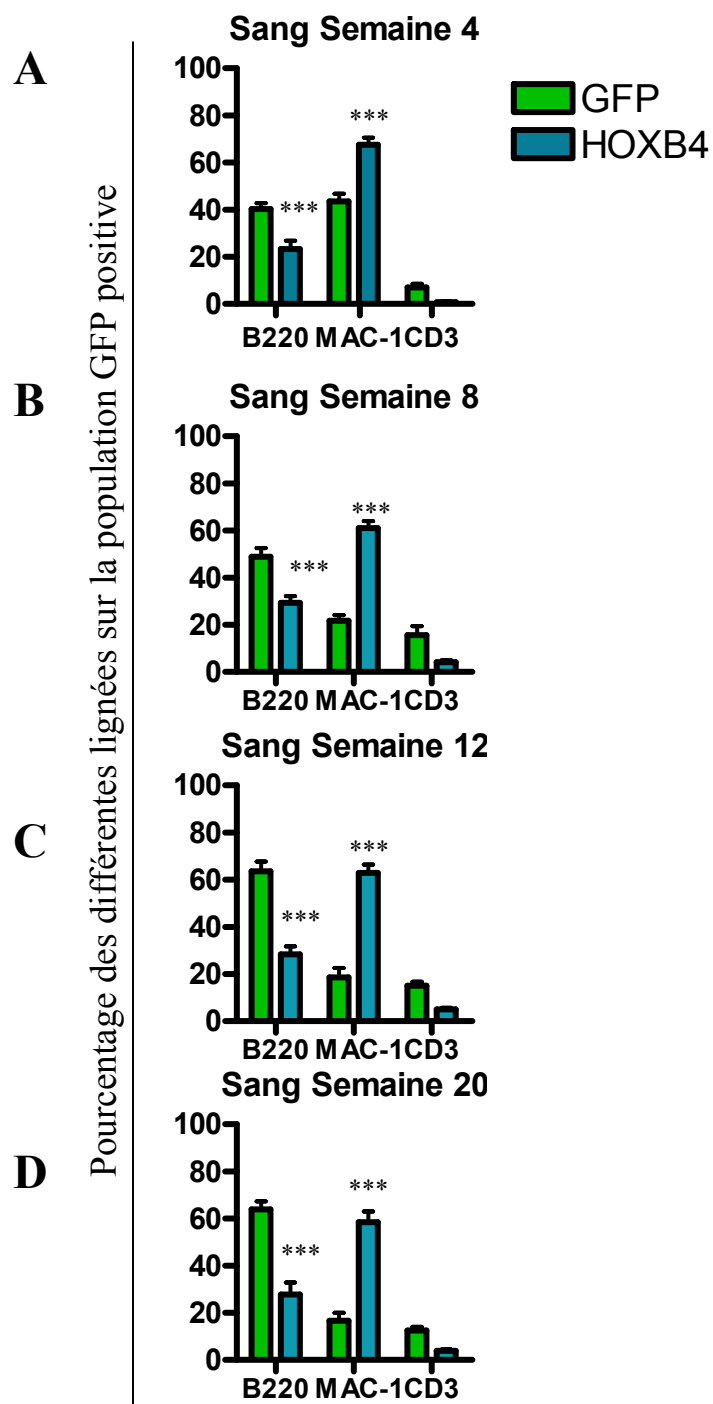
**Figure 5**

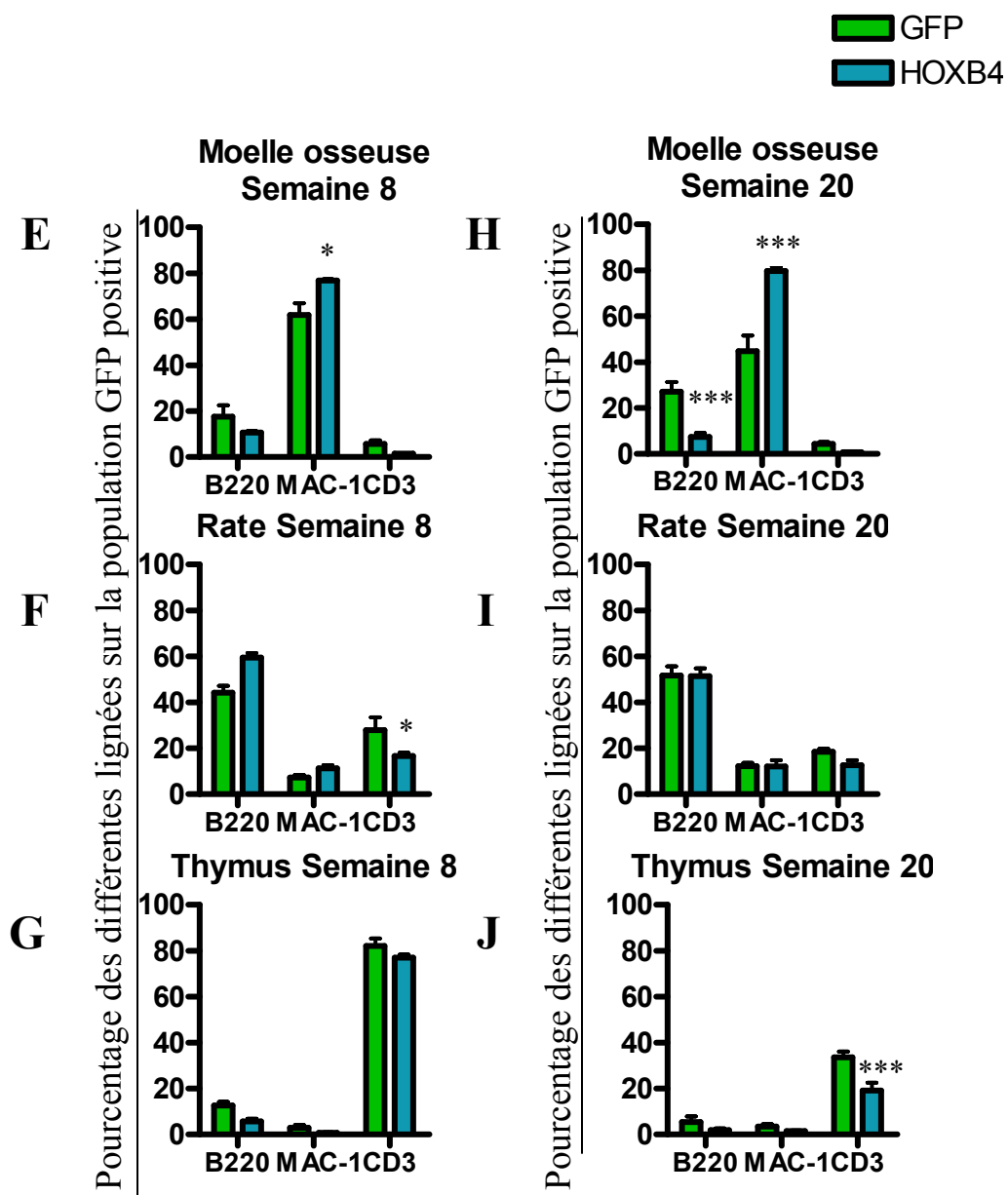


**Figure 6 : Effet de HOXB4 sur la reconstitution des lignées dans les organes périphériques et le sang (greffe de 10 000 cellules).**

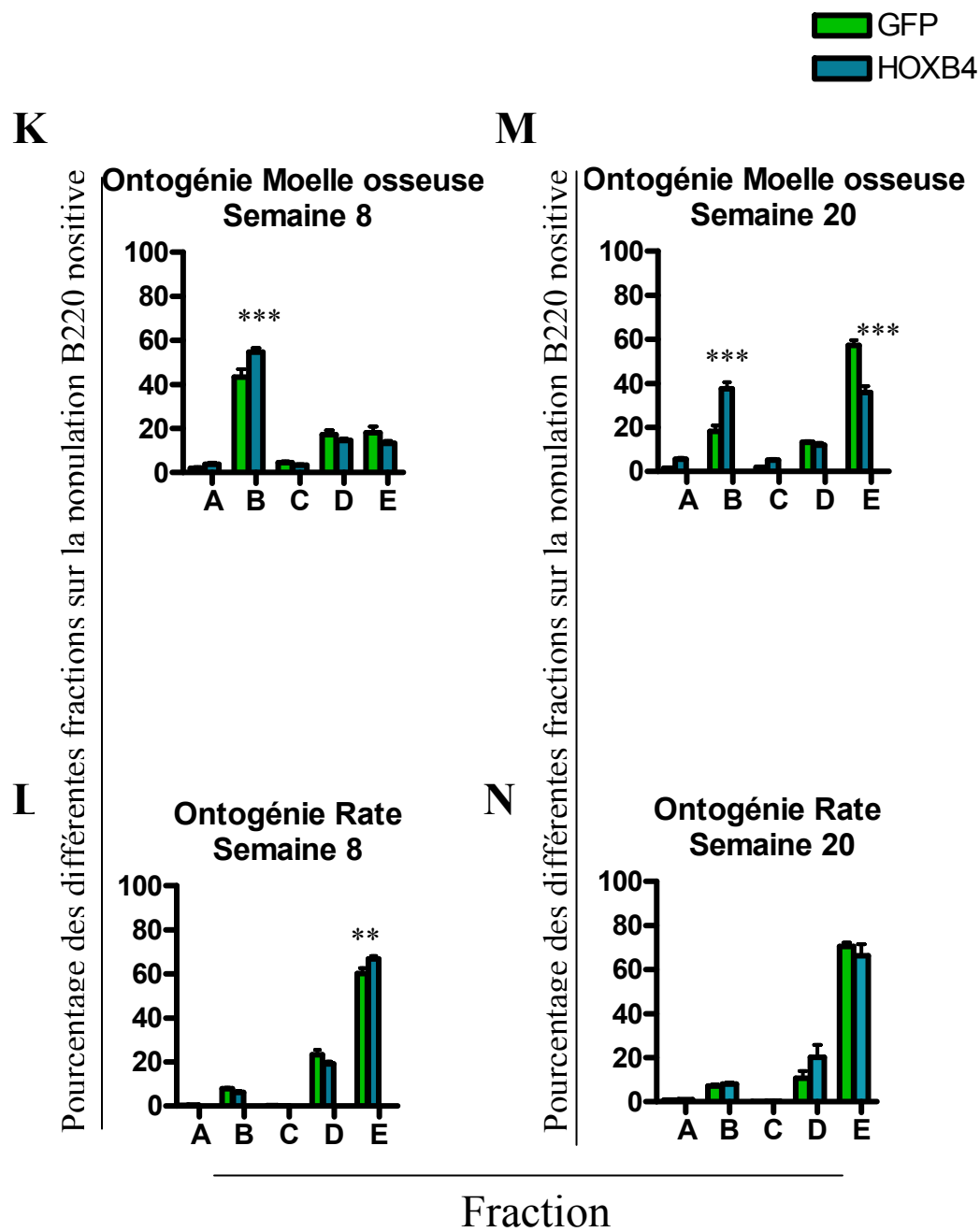
Les figures 6 A B C et D démontrent la contribution des cellules contrôles versus les cellules surexprimant la protéine HOXB4 ayant reconstitué les lignées lymphoïdes et myéloïdes dans le sang à différent temps (semaine 4, 8, 12 et 20 respectivement) pour une greffe de 10 000 cellules GFP ou HOXB4-GFP positives. Il est possible de constater que dès la quatrième semaine post-transplantation, les cellules surexprimant le HOXB4 favorisent la différenciation en cellules MAC-1 (myéloïdes). Les figures 6 E, F et G représentent la contribution de ces mêmes cellules dans les différents organes (moelle osseuse, rate et thymus) à la 8<sup>ième</sup> semaine post-transplantation. Finalement, les figures 6 H, I et J indiquent la contribution des cellules contrôle et des cellules HOXB4 positives dans les mêmes organes à la 20<sup>ième</sup> semaine post-transplantation. Dans la moelle osseuse (6H) il est très clair que les myéloïdes sont favorisés dans le groupe HOXB4 au détriment des cellules lymphoïdes. Dans le thymus, les lymphocytes T (CD3) sont en moins grand nombre dans le groupe HOXB4. En regard du processus de différenciation, les figures K et L démontrent qu'à la 8<sup>ième</sup> semaine post-transplantation, on peut observer, dans la moelle osseuse, que le groupe surexprimant la protéine HOXB4 voit sa fraction B augmenter. Dans la rate, nous ne voyons qu'une faible différence dans la fraction E entre le groupe contrôle et le groupe HOXB4. À la 20<sup>ième</sup> semaine post-transplantation, (Figure M) nous pouvons toujours observer dans la moelle osseuse, une accumulation de cellules dans la fraction B du groupe HOXB4 et une diminution des cellules en

fraction E alors qu'encore une fois, nous ne voyons pas de différence entre les deux groupes dans la rate (Figure N).

**Figure 6**



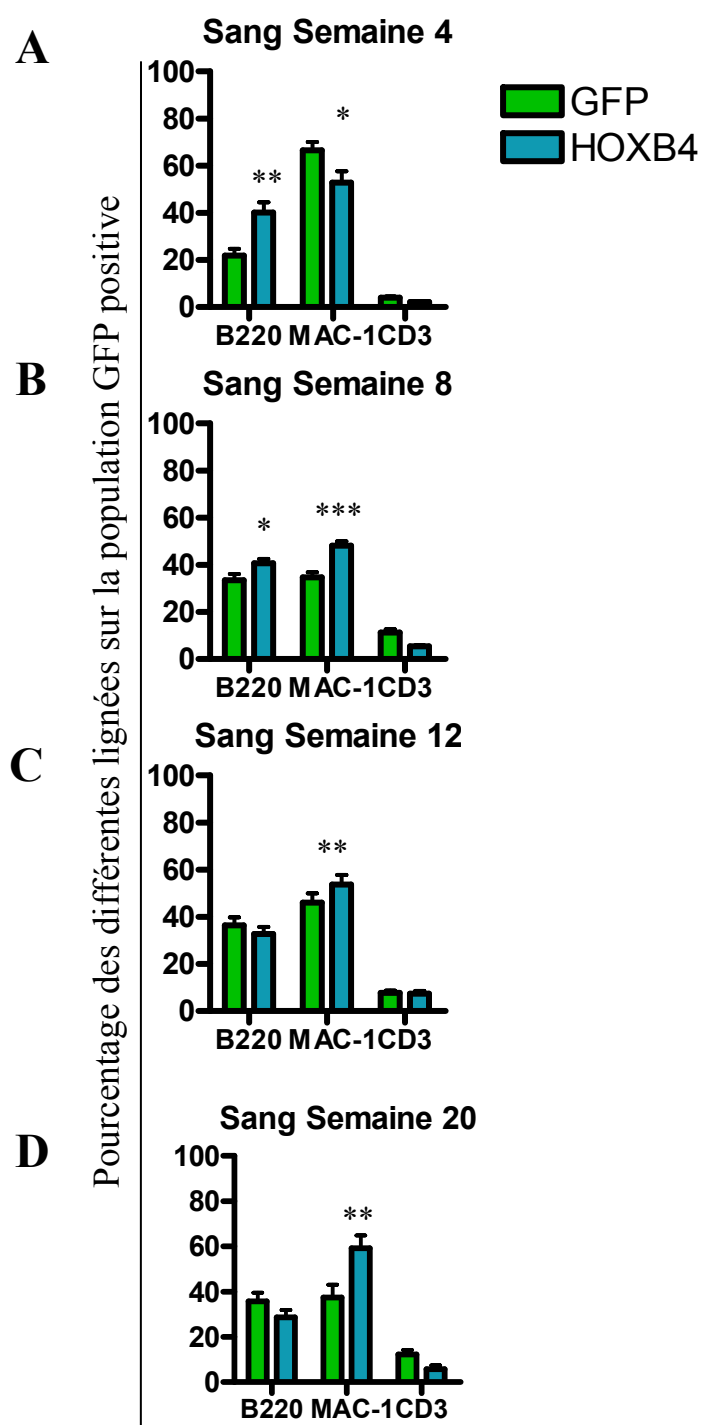


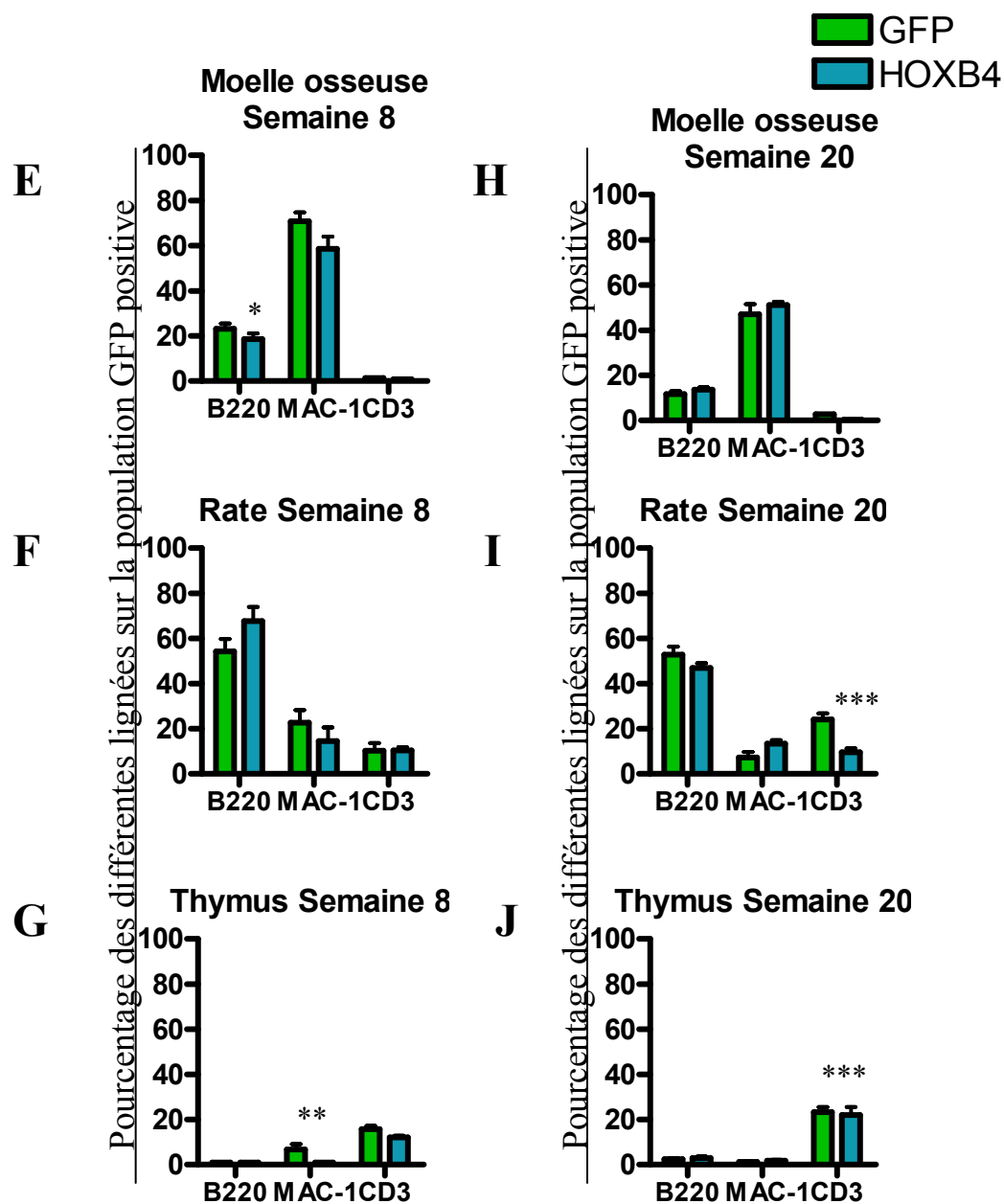


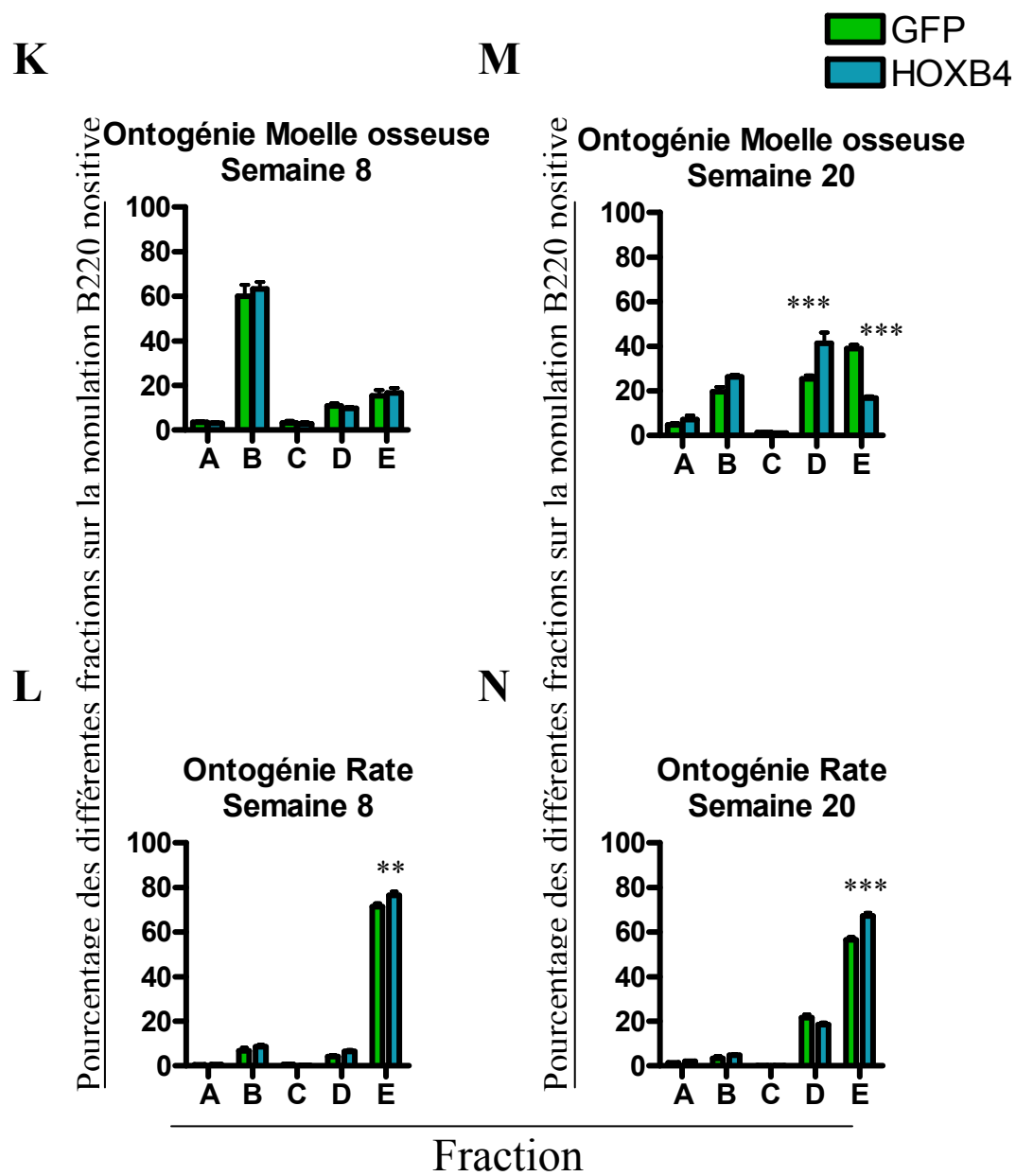
**Figure 7 : Effet de HOXB4 sur la reconstitution des différentes lignées cellulaires dans les organes périphériques et le sang (greffe de 50 000 cellules).**

Les figures 7 A, B C et D démontrent la contribution des cellules contrôles versus les cellules surexprimant la protéine HOXB4 ayant reconstitué les lignées lymphoïdes et myéloïdes dans le sang à différent temps (semaine 4, 8, 12 et 20 respectivement) pour une greffe de 50 000 cellules GFP ou HOXB4-GFP positives. À la 4<sup>ème</sup> semaine post-transplantation nous observons une diminution des cellules myéloïdes et une augmentation des cellules lymphoïdes dans le groupe HOXB4. Par contre, dès la 8<sup>ème</sup> semaine (figure 7B) les cellules myéloïdes sont préférentiellement expansées. Les figures 7 E, F et G nous montrent les organes périphériques à la 8<sup>ème</sup> semaine post-transplantation. Nous n'observons pas de débalancement des lignées dans le groupe HOXB4. A la 20<sup>ème</sup> semaine post-transplantation (figures H, I et J), les profils B, myéloïdes et T sont semblables à ceux observés à 8 semaines dans les organes correspondants.

Quant au processus de différenciation, les figure K et L montrent que dans la moelle osseuse, 8 semaine suite à la transplantation, nous n'observons aucune différence dans les fractions dans le groupe contrôle et le groupe HOXB4. Par contre, à 20 semaines post-transplantation, dans la moelle osseuse, nous pouvons voir une petite accumulation des cellules en fraction D dans le groupe HOXB4 alors qu'il y a une diminution des cellules en fraction E. Dans la rate, nous observons que dans le groupe HOXB4, il y a un peu plus de cellules en fraction E.

**Figure 7**





**Tableau 8 : Effet de HOXB4 sur la fréquence des progéniteurs B**

La figure 8A nous démontre qu'*ex vivo* les cellules progénitrices exprimant la protéine HOXB4 sont moins aptes à se différencier en cellules B matures. En effet, comparativement aux progéniteurs normaux et aux cellules contrôles GFP positives, les progéniteurs HOXB4 positifs sont moins nombreux. Dans la figure 8B, nous observons qu'*in vivo*, les progéniteurs B surexprimant HOXB4 sont également moins nombreux que les progéniteurs B surexprimant la GFP seule. A la 8 et 20<sup>ème</sup> semaine post-transplantation nous n'observons plus aucunes colonies B formées dans le groupe HOXB4.

**Tableau 8****A**

Condition	Fréquence	Moyenne
Normale	1/3370	1/3370
Naïve	1/5995	1/5645
	1/5364	
GFP	1/4383	1/4886
	1/5776	
HOXB4	1/207 750	
	1/97 605	1/156 728
	1/164 830	

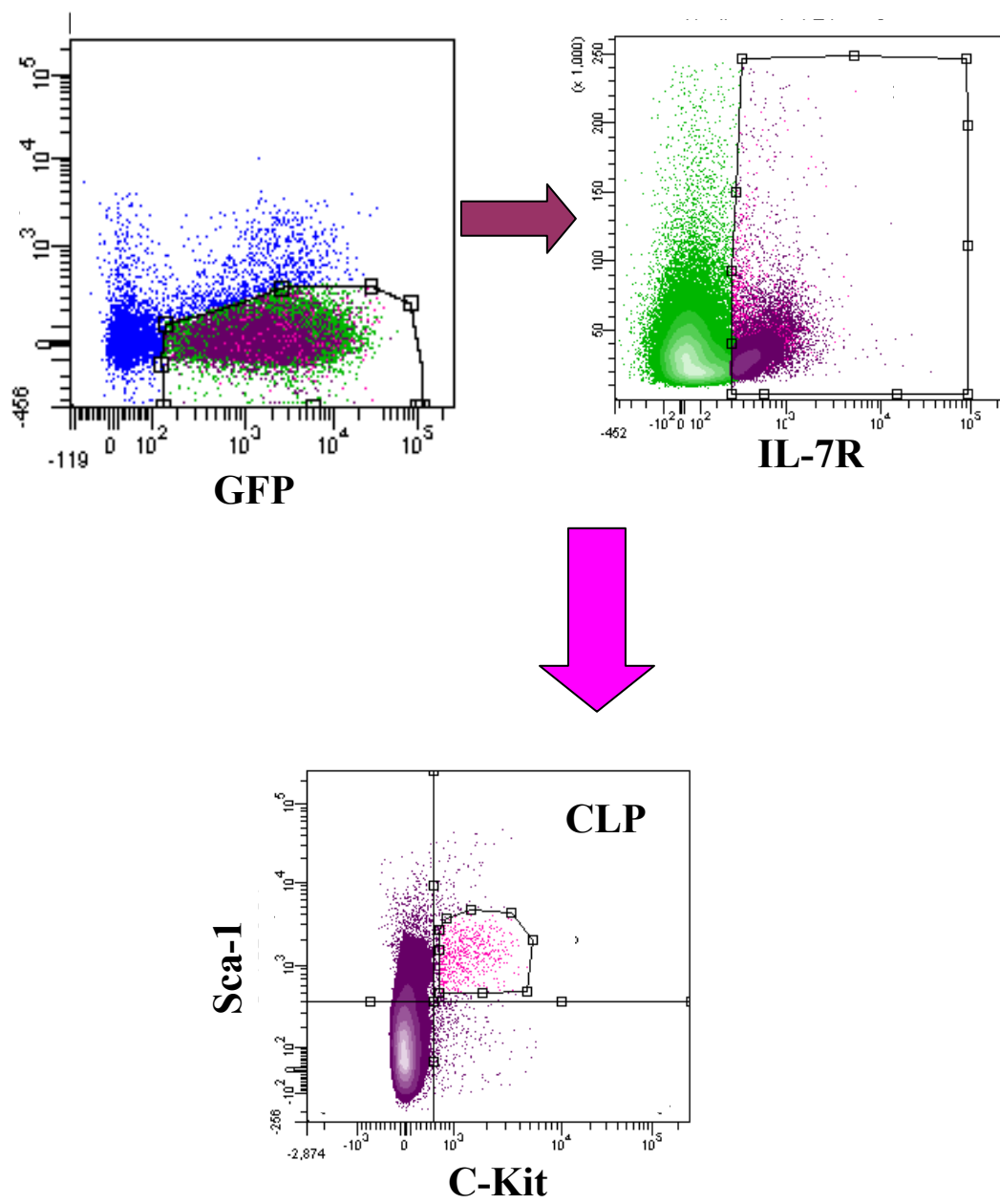
**B**

Condition	Fréquence Jour 0	Fréquence Semaine 8	Fréquence Semaine 20
GFP	1/20 000	1/35 000	1/40 000
HOXB4	1/127 000	0	0

**Figure 9 : Stratégie de tri pour les CLP**

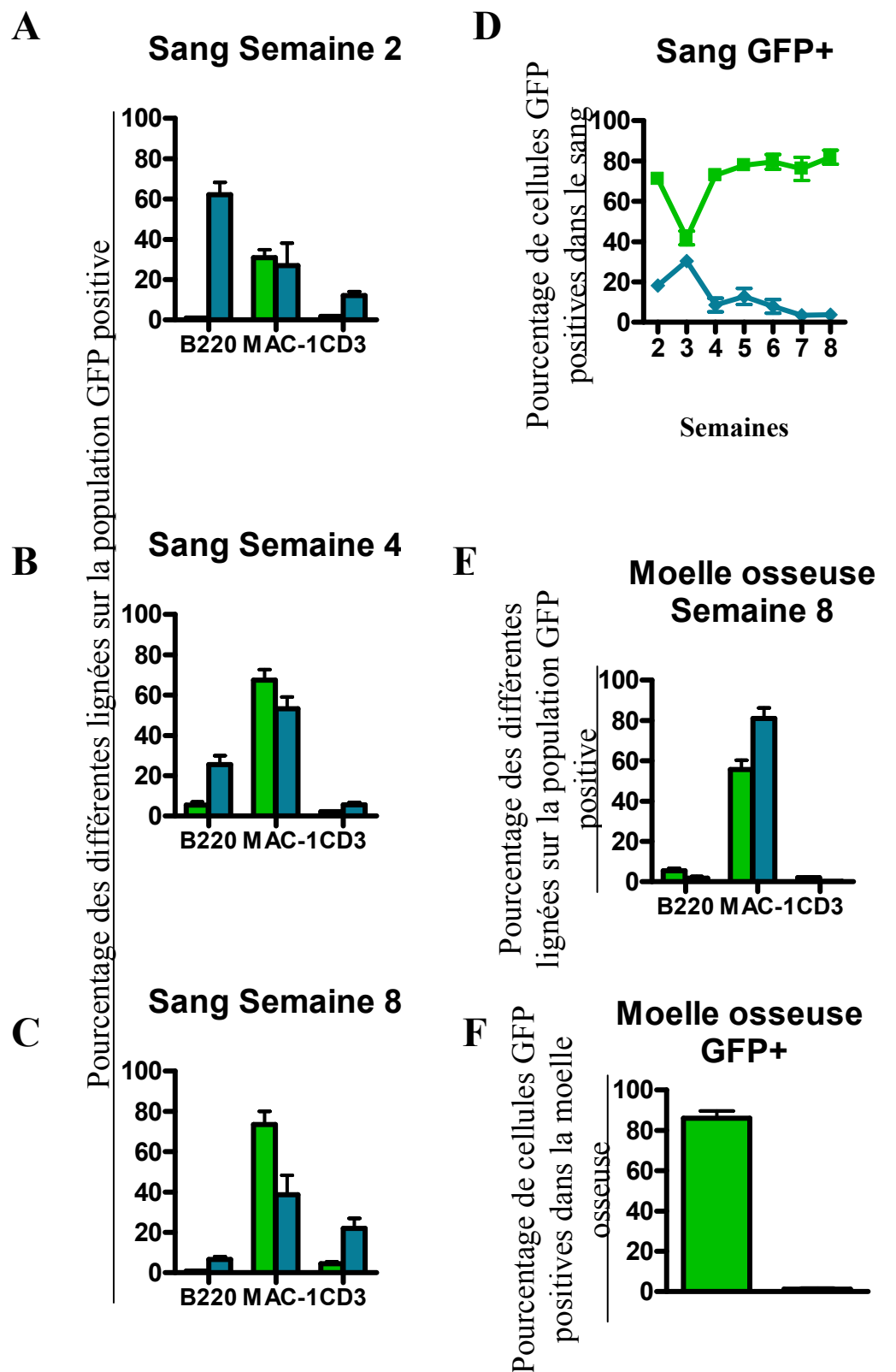
Tel que décrit dans l'introduction, les CLP expriment à leur surface les marqueurs suivants : Lin<sup>-</sup> IL-7R<sup>+</sup> C-Kit<sup>lo</sup> Sca-1<sup>lo</sup>. Suite à notre déplétion de cellules marquées Lin<sup>+</sup> nous avons sélectionné, sur le trieur, les cellules positives pour la GFP ou le HOXB4-GFP puisque nous voulions isoler une population 100% positive pour notre protéine d'intérêt. Puis, comme les CLP expriment le récepteur à l'IL-7, nous avons limité notre population à celle qui exprimait ce récepteur. Finalement, parmi les cellules GFP et IL-7 récepteur positives, nous avons délimité une population qui exprime les marqueurs C-Kit et SCA-1. Ainsi, nous avons obtenu une population pratiquement pure de CLP exprimant le contrôle GFP ou HOXB4-GFP.



**Figure 9 :**

**Figure 10 : Effet de HOXB4 sur les CLP**

La figure 10A représente la contribution des CLP à la reconstitution des différentes lignées dans le sang deux semaines post-transplantation. Les cellules possédant la GFP seule sont principalement des cellules myéloïdes alors que les cellules ayant le HOXB4 se différencient principalement en cellules B. La figure 10B démontre qu'à la 4<sup>ème</sup> semaine post-transplantation, dans le sang, le groupe GFP se différencie toujours en cellules myéloïdes et que le groupe HOXB4 génère moins de cellules myéloïdes en faveur des cellules lymphoïdes. À la figure 10C, 8 semaines après la transplantation, les cellules GFP positives sont presque toutes myéloïdes et les cellules HOXB4 positives sont également devenues majoritairement myéloïdes. La figure 10D nous montre le suivi dans le temps de la quantité de cellules GFP+ présentes dans le sang et la figure 10F la quantité de cellules GFP positives dans la moelle osseuse après 8 semaines de transplantation. Le groupe GFP est bien présent alors que les cellules HOXB4-GFP positives diminuent graduellement. La figure 10 E démontre que la moelle osseuse des souris injectées avec des CLP GFP et HOXB4 devient en grande partie myéloïde.

**Figure 10**

## **Discussion**

Le but ultime de toutes ces expériences est d'arriver à expandre des cellules souches hématopoïétiques sans induire d'expansion des cellules leucémiques résiduelles et en permettant une reconstitution balancée du système sanguin. La protéine HOXB4 a été décrite comme étant un facteur pouvant permettre l'expansion des cellules souches hématopoïétiques mais avant de pouvoir l'utiliser en clinique, nous devons nous assurer que cette protéine est spécifique aux CSH. De plus, comme des expériences faites précédemment dans notre laboratoire avaient suggéré que la surexpression de la protéine HOXB4 favorisait le développement de la lignée myéloïde au détriment de la lignée lymphoïde, nous tenté de comprendre quelle était la cause de cette stimulation différentielle.

### **9.1 Effet de la protéine HOXB4 sur les cellules leucémiques humaines et murines**

Nous nous sommes principalement intéressés aux cellules malignes lymphoïdes B puisque les lymphomes non-Hodgkiniens représentent une des principales indications de greffe de cellules souches autologues. Nous avons cherché à savoir si, dans un contexte leucémique, la protéine expandrait les cellules « souches » leucémiques ou lymphomateuses de la lignée B comme elle le fait pour les CSH ou si, au contraire, elle inhiberait ces cellules comme elle semblait le faire avec les cellules B normales. Les expériences effectuées *in vitro* sur des cellules humaines avec la protéine HOXB4 soluble (TAT-HOXB4) nous ont permis de constater l'absence d'augmentation de la population leucémique suite à une culture avec HOXB4. Comme nous avons préalablement remarqué que les

cellules surexprimant la protéine HOXB4 se différenciaient dans la lignée myéloïde, nous avons émis l'hypothèse que des cellules leucémiques myéloïdes mises en culture avec la protéine HOXB4 pourraient voir leur population leucémique augmenter. Au contraire, nos expériences nous ont permis de démontrer que même en présence de HOXB4, la population myéloïde d'un sujet avec une LMA diminue grandement après la culture. Nous avons par la suite pu confirmer ces données grâce à un essai de culture en milieu semi-solide qui nous a démontré non seulement que les cellules matures n'étaient pas augmentées mais que même les progéniteurs myéloïdes donnant naissance aux granulocytes/macrophages présents dans notre culture n'ont pas été augmentés suite à l'exposition à la protéine HOXB4. Nous avons observé une diminution du nombre de cellules suite aux 4 jours de culture autant dans le groupe contrôle que dans le groupe traité. La perte de cellules suite à la culture est ainsi probablement attribuable aux conditions de cette culture.

Nous avons ensuite évalué la capacité de HOXB4 à amener une expansion des cellules de lymphome non-Hodgkinien de la lignée B. Les figures 2 et 3 démontrent que les cellules ayant été traitées avec HOXB4 ne démontrent aucune différence d'expansion avec les cellules incubées dans un milieu sans HOXB4. Ces résultats sont demeurés identiques alors que les cellules de lymphome ont été aussi incubées dans deux différents milieux de culture. Ces données sont particulièrement intéressantes pour l'utilisation clinique de HOXB4 dans un contexte de greffe autologue pour des patients atteints de lymphome non-

Hodgkinien. Ils indiquent qu'il n'y a pas de crainte que cette protéine recombinante qui démontre une capacité à expandre les cellules souches hématopoïétiques puisse aussi expandre les cellules lymphomateuses de la lignée B. Ceci n'est pas tout à fait étonnant puisque les cellules de la lignée B sont beaucoup plus différenciées que les cellules souches hématopoïétiques.

Néanmoins, certains groupes ont décrit des progéniteurs des cellules de lymphome non-Hodgkinien qui présentaient des caractéristiques plus immatures. Certains progéniteurs lymphoïdes pourraient même exprimer le marqueur CD34 retrouvé dans les cellules souches.<sup>176</sup> Le fait que le CD19 ou le CD20 pourraient être absents de progéniteurs lymphomateux de la lignée B nous a amené à compléter ces analyses de la croissance des cellules malignes avec une approche qui n'impliquait pas de flux cytométrie et de marqueurs de surface. Nous avons donc effectué des analyses de PCR niché sur des échantillons de LNH afin de quantifier les cellules malignes qui sont caractérisées par la présence de la translocation (14:18). La PCR multiplex nous a permis de démontrer que HOXB4 générerait un nombre de cellules avec une t(14 ;18) grossièrement semblable à celui des cellules incubées sans HOXB4. De façon à raffiner notre analyse, nous avons réalisé des réactions de PCR semi-quantitatives. Ainsi, nous avons pu conclure que la protéine HOXB4 n'expandait pas la population lymphomateuse puisque dans chaque échantillon étudié nous retrouvions le même nombre (0.05%) de cellules présentant cette même translocation (14 ;18). Nous avons aussi confirmé l'absence d'expansion des cellules malignes de la lignée B en analysant l'effet de

HOXB4 sur des cellules de leucémie lymphoïde chronique provenant directement d'un patient. Toutefois, il y a un bémol à mettre sur ces résultats. En effet, même si nous ne voyons aucune augmentation des populations leucémiques qui ont été cultivées avec la protéine TAT-HOXB4 par rapport à notre contrôle, il se pourrait que cela soit dû aux conditions *in vitro* qui ne sont pas fidèles aux conditions retrouvées *in vivo*. Également, le fait d'effectuer une décongélation sur ces échantillons de cellules peut nuire aux cellules néoplasiques et en éliminer durant le processus de décongélation. Afin de pouvoir réellement conclure que la protéine HOXB4 n'apporte aucune augmentation des populations leucémiques, il serait possible de réaliser des études dans les souris immunodéficientes. Ainsi, les conditions *in vivo* seraient recréées. En greffant des souris avec des cellules fraîchement décongelées versus des cellules cultivées 4 jours avec et sans la protéine nous pourrions évaluer l'effet de HOXB4 sur les cellules potentiellement initiatrices de la leucémie, ce qui nous permettrait de confirmer que nos cellules cibles, i.e. les cellules « souches » leucémiques survivent à la décongélation. Il demeurera cependant des discordances importantes entre les modèles murins et l'environnement humain qui limiteront l'interprétation.

Ainsi, pour tenter de confirmer ces résultats obtenus *in vitro* nous sommes passés dans un modèle murin afin de pouvoir observer l'effet de la surexpression de la protéine HOXB4 dans une leucémie lymphoblastique murine B. Après avoir réussi à établir la fréquence de cellules leucémiques qui pouvaient induire la leucémie nous avons voulu infecter des cellules afin qu'elles surexpriment



HOXB4. Les premiers essais ont été non concluants puisque nous n'avons pas réussi à obtenir des cellules surexprimant notre protéine d'intérêt. Nous avons alors cru que nos cellules ne proliféraient pas suffisamment pour permettre l'entrée des virus. En effet, il est important que les cellules entrent dans le cycle cellulaire afin d'obtenir une intégration virale. L'essai au CFSE nous a permis de démontrer que les cellules présentaient des divisions cellulaires théoriquement suffisantes pour permettre une infection adéquate. Nous avons donc évalué un changement du milieu de culture pour tenter de favoriser l'infection des CLP. Cet autre changement ne nous a pas permis d'obtenir une meilleure infection de nos cellules leucémiques. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'il était possible que les cellules leucémiques ne possèdent pas le récepteur cellulaire permettant aux virus de se lier et de pénétrer dans la cellule. À ce moment, nous avons donc utilisé la forme soluble de la protéine HOXB4. Malheureusement, les doses de cellules injectées aux souris suite à notre culture avec la protéine recombinante HOXB4 étaient insuffisantes et très peu d'animaux ont développé la leucémie, ce qui nous a limité dans notre capacité de déterminer l'impact de HOXB4 sur les fréquences de cellules leucémiques. Il sera intéressant de répéter cette expérience lorsqu'une nouvelle production de la protéine HOXB4 sera réalisée.

## **9.2 Effet de la protéine HOXB4 sur la différenciation et la fréquence des progéniteurs B**

Des expériences réalisées précédemment dans notre laboratoire ont suggéré que la surexpression de HOXB4 défavorisait les cellules lymphoïdes aux dépens des

cellules myéloïdes. Nous avons tenté dans le présent travail de déterminer si la protéine HOXB4 pouvait altérer le processus de développement / différenciation des cellules B. Nous avons d'abord émis l'hypothèse que le nombre de cellules surexprimant HOXB4 administrées pouvait avoir un impact sur la génération de cellules de la lignée B. En effet, le stress engendré par l'irradiation, dans un contexte de limitation de cellules avec potentiel de régénération, pourrait pousser les cellules à se différencier de façon préférentielle vers la lignée myéloïde. Ainsi la reconstitution hématologique post-greffe favorise d'abord une récupération des cellules myéloïdes, qui représentent la première ligne de défense contre les infections. La reconstitution lymphoïde qui est une deuxième ligne de défense dont l'organisme n'a souvent pas besoin de façon immédiate survient habituellement plus tardivement. Ceci implique que l'organisme greffé, qui se retrouve dans des conditions déficit myéloïde, produit d'abord des médiateurs de type cytokines et chémokines faisant la promotion d'une récupération myéloïde. Afin de reproduire un contexte de limitation en cellules souches, nous avons d'abord évalué l'impact de la diminution du nombre de cellules injectées, soit 50 000 et de 10 000 cellules positives pour le contrôle GFP et pour la protéine HOXB4. Les expériences précédentes avaient été réalisées en injectant 50 000 cellules infectées par HOXB4. Dans les deux concentrations de cellules administrées, nous avons observé que la surexpression de HOXB4 favorise la reconstitution myéloïde. Cependant, nous avons pu effectivement observer que les cellules myéloïdes présentaient une récupération accrue au détriment des cellules lymphoïdes dans les receveurs ayant reçu un nombre initial plus faible de cellules

(seulement 10 000 cellules), et ce même si la différence dans le nombre de cellules injectées était relativement faible. Au niveau de la moelle osseuse, nous observons une prédominance myéloïde dans les souris qui ont reçu une quantité plus faible de cellules surexprimant HOXB4, alors que les souris qui ont reçu un plus grand nombre de ces cellules ne présentent pas de reconstitution myéloïde augmentée dans leur moelle osseuse. Cette observation vient renforcer notre hypothèse d'un impact environnemental sur la différenciation cellulaire. Cependant, à long terme, les cellules HOXB4 positives amènent une prédominance de la lignée myéloïde qui est du même ordre de grandeur dans le sang, peu importe le nombre de cellules initialement injectées.

A la 8<sup>ième</sup> semaine post-transplantation, l'absence d'augmentation des cellules myéloïdes dans la moelle des souris recevant des cellules surexprimant HOXB4 pourrait être due à un délai dans l'impact des médiateurs solubles favorisant la différenciation myéloïde. Par contre, l'absence de différence entre les cellules du groupe contrôle et du groupe HOXB4 à la 20<sup>ième</sup> semaine post-transplantation au niveau de la moelle osseuse ne permet pas d'expliquer la reconstitution myéloïde accrue au niveau du sang dans le groupe HOXB4. Cette observation pourrait indiquer que la surexpression maintenue de HOXB4 rend les cellules plus susceptibles à une différenciation myéloïde capable de migrer au niveau périphérique (sang), mais que son impact au niveau central (médullaire) est plus faible.

Dans la moelle osseuse, l'ontogénie, c'est-à-dire la différenciation des cellules B, démontre un ralentissement de ce processus dans les deux groupes de cellules surexprimant HOXB4. En effet, dans le groupe injecté avec 10 000 cellules, nous constatons une accumulation de leur la fraction B ainsi qu'une diminution de la fraction E dans le groupe HOXB4 comparativement au contrôle. Dans le groupe 50 000 cellules on peut observer de plus une accumulation dans la fraction D dans le groupe HOXB4 à la 20<sup>ième</sup> semaine post-transplantation. Mis ensemble, ces résultats suggèrent que les cellules B surexprimant la protéine HOXB4 sont capables de passer à travers toutes les étapes de l'ontogénie B mais que ce processus s'effectue sur une période plus longue que s'il n'y a pas de surexpression de HOXB4. Les cellules semblent présenter plus de difficulté à passer d'une fraction à l'autre, elles s'accumulent ainsi à des stades intermédiaires de différenciation. A la fin du processus, nous retrouvons moins de cellules immatures (fraction E) dans le groupe HOXB4 comparativement au groupe GFP. Cette diminution peut expliquer pourquoi on observe une diminution de cellules B dans le sang et les organes comme la rate puisque la cellule immature est la cellule B qui provient de la moelle osseuse et se dirige vers la périphérie afin de jouer son rôle dans la protection contre les organismes infectieux. Lorsque nous regardons dans la rate, nous n'avons pas identifié de différence entre les différentes fractions des groupes GFP et HOXB4 dans nos deux conditions d'injections. La rate n'étant pas le site primaire de la lymphopoïèse, les cellules de la moelle osseuse entrent dans la circulation pour migrer vers la rate et les organes lymphoïdes secondaires. L'absence de différence dans l'ontogénie à ce

moment suggère que la surexpression de HOXB4 agit lors de la différenciation des cellules B qui se produit au niveau médullaire, mais n'affecte pas la distribution des cellules B ayant atteint un stade plus mature et exerçant leur rôle en périphérie. De plus, nous avons pu constater que HOXB4 ne semble pas affecter la migration ou la distribution des cellules B dans la rate.

En regard de la fréquence des progéniteurs B qui se différencient en lymphocytes B, nous avons observé que les cellules possédant la protéine HOXB4 surexprimée avaient une fréquence de différenciation beaucoup plus petite que les cellules normales, possédant le virus vide ou encore la GFP seule. Normalement, on compte 1 cellule sur 5000 qui est un progéniteur B. Nous avons observé des fréquences se rapprochant de ce niveau théorique pour les cellules normales, les cellules ayant été infecté avec un virus vide et les cellules surexprimant la GFP alors que pour le groupe HOXB4 nous avons obtenu une fréquence plus de 30 fois inférieure. À 8 et 20 semaines post-transplantation, nous ne voyons aucune colonie B formée dans notre essai alors que nous pouvons en compter dans le groupe GFP. Ces résultats nous indiquent que la protéine HOXB4 agit sur les progéniteurs B en les empêchant de se différencier en lymphocytes B. *In vivo*, nous pouvons constater également une diminution de la fréquence des progéniteurs dans le groupe HOXB4.

Malgré les constants efforts de plusieurs équipes de recherche, il n'y a, à ce jour, aucune cible connue pour le facteur de transcription HOXB4. Nous ne savons

donc pas quel le facteur HOXB4 pourrait influencer pour ainsi diminuer la quantité de cellules lymphoïdes produites par les cellules souches et progéniteurs surexprimant la protéine en question. Cependant, plusieurs facteurs de transcription essentiels au bon développement de la lignée lymphoïde sont connus. Parmi les plus importants, nous notons *ikaros*, E2A, EBF et PAX-5. Tous ces facteurs sont impliqués dans la différenciation et la maturation des cellules B. Il est alors possible qu'ils interagissent avec HOXB4 afin de diminuer la progression de la cellule dans son processus de maturation. Ainsi, les facteurs E2A et EBF jouent un rôle dans le réarrangement des chaînes des immunoglobulines. Lorsque la cellule transite de la fraction B vers la fraction C, elle réarrange ses chaînes lourdes afin de présenter un pré-récepteur B en fraction C et en fraction D, la cellule B réarrange ses chaînes légères pour exprimer son récepteur B sur la cellule immature (fraction E). Or, nous pouvons observer un ralentissement dans la transition entre les fractions B et C ainsi que les fractions D vers E. Il est possible que ce ralentissement soit dû au fait que ces deux facteurs sont moins disponibles pour la cellule ou qu'ils soient modifiés par une interaction possible avec la protéine HOXB4. Il est également possible que le facteur PAX-5 soit impliqué puisqu'il a été démontré que si le facteur était en quantité insuffisante, les cellules B pouvaient se différencier en cellules de la lignée myéloïde. Une autre possibilité est que HOXB4 favorise la transcription du facteur PU.1. Il a été démontré que lorsque PU.1 est en trop grande quantité, les cellules lymphoïdes diminuent et les cellules myéloïdes sont favorisées.

### **9.3 Effet de HOXB4 sur les CLP**

Les résultats obtenus lors de ces expériences nous démontrent que les cellules progénitrices surexprimant la protéine HOXB4 ont un désavantage au niveau de la prolifération. Contrairement aux cellules qui surexpriment la GFP seulement, les cellules qui portent le HOXB4 se sont divisées en moins grande quantité dans les receveurs. A 8 semaines après la transplantation, les cellules GFP forment 80% des cellules totales de la moelle osseuse alors que les cellules HOXB4 forment moins de 10% de la moelle osseuse totale. Au niveau du sang, 2 semaines après la transplantation, la majorité des cellules surexprimant HOXB4 sont des cellules B, mais leur nombre diminue rapidement à la semaine 4 pour mener à une prédominance de cellules myéloïdes. De plus, la quantité de cellules HOXB4 positives dans le sang diminue de façon importante pour atteindre moins de 5% à 8 semaines. Au fil des semaines, les cellules lymphoïdes disparaissaient pour laisser la place principalement aux cellules myéloïdes dans le sang comme dans la moelle osseuse. L'origine de ces dernières cellules demeure à déterminer. D'après ces résultats, nous pouvons conclure que HOXB4 agit sur les CLP en ralentissant leur division comme les expériences *in vitro* l'ont démontré. Le peu de cellules B et T produites à partir des CLP disparaît relativement rapidement dans le sang et la moelle osseuse des souris receveuses pour laisser place aux cellules myéloïdes. Il est possible que la protéine HOXB4 agisse au niveau des facteurs PU.1 et *Ikaros* ou encore au niveau du récepteur des cytokines IL-7 et FLT-3 ce qui empêcherait le progéniteur lymphoïde de s'engager vers la lignée B

ou T. Toutefois, malgré le fait que les cellules portant HOXB4-GFP ont un désavantage au niveau prolifératif, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer pourquoi les cellules contrôles qui n'expriment que la GFP ont dévié vers la lignée myéloïde alors qu'elles auraient pu se différencier dans la lignée lymphoïde. Il est possible que ces résultats soient dus au triage des cellules ou à un autre phénomène qu'il reste à identifier. Cependant nous pouvons retenir que les cellules surexprimant HOXB4-GFP semblent ralenties dans leur processus de prolifération.



## **Conclusions et perspectives**

La protéine HOXB4 possède un excellent pouvoir d'auto-renouvellement sur les CSH et cela présente un immense potentiel pour une utilisation clinique. Même si les cellules surexprimant le HOXB4 créent, chez la souris, un déséquilibre entre la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde, nos études démontrent que la protéine n'affecte pas les cellules leucémiques, même si ces dernières proviennent d'une leucémie B humaine. En présence de HOXB4, les cellules leucémiques ne sont pas augmentées. Quant aux cellules B normales et leurs progéniteurs, nos travaux indiquent que HOXB4 ralentit leur prolifération et affecte leur différenciation. En effet, les CLP surexprimant HOXB4 prolifèrent moins que les cellules contrôles et les cellules B produites par ces CLP se différencient plus lentement que ces mêmes cellules contrôles.

Certaines expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois et malgré un grand nombre d'animaux testés, il sera utile de répéter ces expériences. Afin de pousser plus loin dans l'investigation des mécanismes de différenciation B, il serait intéressant de réaliser des expériences en dilution limite dans les souris leucémiques E2A-PBX1 avec une protéine soluble TAT-HOXB4. Ceci permettrait de confirmer que même *in vivo* la présence de HOXB4 n'agit pas sur les cellules initiatrices de la leucémie. De plus, il serait intéressant d'exposer des cellules malignes humaines à HOXB4 et à mesurer son impact sur leur reconstitution *in vivo*.

Peu de cibles moléculaires du facteur de transcription HOXB4 ont été décrites jusqu'à aujourd'hui. Il est donc difficile de savoir à quels gènes il se lie afin de ralentir le processus de différenciation de nos cellules B qui surexpriment la protéine HOXB4 et également de déterminer pourquoi les progéniteurs B ont une fréquence beaucoup moindre lorsqu'ils surexpriment HOXB4 par rapport aux cellules contrôles. Il y a plusieurs cibles possibles décrites dans la littérature comme étant des éléments très importants pour la maturation et l'engagement des cellules lymphoïdes B. Il pourrait être intéressant de déterminer si ces facteurs, tels que *Ikaros*, PU.1, Pax-5, E2A, EBF, IL-7R et FLT-3, sont modifiés en présence de HOXB4.

De plus, il sera extrêmement intéressant de confirmer sur des cellules humaines traitées avec HOXB4 si ce dernier confère un avantage prolifératif aux cellules myéloïdes tout comme nous pouvons l'observer chez la souris. Les présents travaux renforcent l'importance, lors de travaux cliniques, d'injecter un nombre important de cellules souches afin de favoriser une reconstitution myéloïde mais aussi lymphoïde. Ceci renforce aussi l'utilité d'une stratégie d'expansion ex vivo utilisant HOXB4, milieu qui n'est pas influencé par les cytokines endogènes et qui pourra fournir au patient un nombre accru de CSH et favorisera une reconstitution à la fois hématologique et immunologique.

Les résultats obtenus dans ce travail ont permis de mieux cerner l'action de HOXB4 sur les cellules lymphoïdes et myéloïdes. Les résultats apportés par ces recherches contribueront dans un avenir prochain à améliorer le sort des patients

avec des hémopathies malignes en permettant une expansion de leurs cellules souches normales par HOXB4.

## **Bibliographie**

1. Richard A.Goldsby, Thomas J.Kindt, Barbara A.Osborne. Immunologie, le cours de Janis Kuby.: W.H. Freeman and company New York; 2000.
2. Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1999;96:3120-3125.
3. Metcalf D. The molecular control of blood cells.; 1988.
4. van Oostveen J, Bijl J, Raaphorst F, Walboomers J, Meijer C. The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies  
Leukemia 1999;13:1675-1690.
5. Palis J, McGrath KE, Kingsley PD. Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac explants. Blood 1995;86:156-163.
6. Detrich HW, III, Kieran MW, Chan FY et al. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development.  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1995;92:10713-10717.
7. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow  
Cell 1997;91:661-672.

8. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. 1994;1:661-673.
9. Harrison DE, Zhong RK. The same exhaustible multilineage precursor produces both myeloid and lymphoid cells as early as 3-4 weeks after marrow transplantation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992;89:10134-10138.
10. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273:242-245.
11. Mikkola HK, Orkin SH. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 2006;133:3733-3744.
12. Lessard J, Faubert A, Sauvageau G. Genetic programs regulating HSC specification, maintenance and expansion. *Oncogene* 2004;23:7199-7209.
13. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988;241:58-62.
14. Uchida N, Weissman IL. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1<sup>lo</sup> Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J.Exp.Med.* 1992;175:175-184.

15. Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K et al. Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. *Blood* 1991;78:1706-1712.
16. Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K et al. In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells *Blood* 1992;80:3044-3050.
17. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 1995;11:35-71.
18. Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N et al. Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *J.Cell Biol.* 1993;122:897-902.
19. Morrison SJ, Lagasse E, Weissman IL. Demonstration that Thy(1a) subsets of mouse bone marrow that express high levels of lineage markers are not significant hematopoietic progenitors. *Blood* 1994;83:3480-3490.
20. Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 1997;124:1929-1939.
21. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev.Immunol* 2006;6:93-106.

22. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978;4:7-25.
23. Huang X, Cho S, Spangrude GJ. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal  
*Cell Death.Differ.* 2007;14:1851-1859.
24. Askenasy N, Zorina T, Farkas DL, Shalit I. Transplanted hematopoietic cells seed in clusters in recipient bone marrow in vivo. *Stem Cells* 2002;20:301-310.
25. Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998;91:1101-1134.
26. Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 1988;335:88-89.
27. Geissler EN, Ryan MA, Housman DE. The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 1988;55:185-192.
28. Williams DE, Eisenman J, Baird A et al. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* 1990;63:167-174.



29. Huang E, Nocka K, Beier DR et al. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* 1990;63:225-233.
30. Anderson DM, Lyman SD, Baird A et al. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell* 1990;63:235-243.
31. Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK et al. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver--conditioned medium. *Cell* 1990;63:195-201.
32. Martin FH, Suggs SV, Langley KE et al. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell* 1990;63:203-211.
33. Potocnik AJ, Brakebusch C, Fassler R. Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity*. 2000;12:653-663.
34. Moore MA. Cytokine and chemokine networks influencing stem cell proliferation, differentiation, and marrow homing  
*J.Cell Biochem.Suppl* 2002;38:29-38.
35. Mohle R, Bautz F, Rafii S et al. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and

mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* 1998;91:4523-4530.

36. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996;382:635-638.
37. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998;393:595-599.
38. Arai F, Hirao A, Ohmura M et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004;118:149-161.
39. Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T et al. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* 2004;18:2747-2763.
40. Cheng T, Rodrigues N, Shen H et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 2000;287:1804-1808.
41. Yuan Y, Shen H, Franklin DS, Scadden DT, Cheng T. In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat.Cell Biol.* 2004;6:436-442.

42. Yu H, Yuan Y, Shen H, Cheng T. Hematopoietic stem cell exhaustion impacted by p18 INK4C and p21 Cip1/Waf1 in opposite manners. *Blood* 2006;107:1200-1206.
43. Kato Y, Iwama A, Tadokoro Y et al. Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J.Exp.Med.* 2005;202:169-179.
44. Chung YJ, Park BB, Kang YJ et al. Unique effects of Stat3 on the early phase of hematopoietic stem cell regeneration. *Blood* 2006;108:1208-1215.
45. Sitnicka E, Bryder D, Theilgaard-Monch K et al. Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity*. 2002;17:463-472.
46. Li CL, Johnson GR. Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood* 1994;84:408-414.
47. Ikuta K, Weissman IL. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992;89:1502-1506.
48. Matsunaga T, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M. Thrombopoietin promotes the survival of murine hematopoietic long-term reconstituting cells:

comparison with the effects of FLT3/FLK-2 ligand and interleukin-6.  
Blood 1998;92:452-461.

49. McKinstry WJ, Li CL, Rasko JE et al. Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 1997;89:65-71.
50. Sitnicka E, Lin N, Priestley GV et al. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. Blood 1996;87:4998-5005.
51. Solar GP, Kerr WG, Zeigler FC et al. Role of c-mpl in early hematopoiesis. Blood 1998;92:4-10.
52. Thoren LA, Liuba K, Bryder D et al. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. J.Immunol. 2008;180:2045-2053.
53. Keller JR, Ortiz M, Ruscetti FW. Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division. Blood 1995;86:1757-1764.
54. Luc S, Buza-Vidas N, Jacobsen SE. Delineating the cellular pathways of hematopoietic lineage commitment  
Semin.Immunol 2008;20:213-220.
55. Laiosa CV, Stadtfeld M, Graf T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. Annu.Rev.Immunol. 2006;24:705-738.

56. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008;132:631-644.
57. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-111.
58. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages *Nature* 2000;404:193-197.
59. Metcalf D. Stem cells, pre-progenitor cells and lineage-committed cells: are our dogmas correct? *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999;872:289-303.
60. Dexter TM. Introduction to the haemopoietic system. *Cancer Surv.* 1990;9:1-5.
61. Akashi K, Kondo M, von Freeden-Jeffry U, Murray R, Weissman IL. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* 1997;89:1033-1041.
62. Singh H, Medina KL, Pongubala JM. Contingent gene regulatory networks and B cell fate specification *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005;102:4949-4953.
63. Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D et al. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is

- accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. 2001;15:659-669.
64. Mackarehtschian K, Hardin JD, Moore KA et al. Targeted disruption of the *flk2/flt3* gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*. 1995;3:147-161.
  65. Busslinger M. Transcriptional control of early B cell development. *Annu.Rev.Immunol* 2004;22:55-79.
  66. Traver D, Akashi K, Manz M et al. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 2000;290:2152-2154.
  67. Miller JP, Izon D, DeMuth W et al. The earliest step in B lineage differentiation from common lymphoid progenitors is critically dependent upon interleukin 7. *J.Exp.Med.* 2002;196:705-711.
  68. Zouali M, MacLennan IC. Molecular events in the development of the lymphocyte repertoire. *Immunol.Today* 1992;13:41-43.
  69. Haks MC, Oosterwegel MA, Blom B, Spits HM, Kruisbeek AM. Cell-fate decisions in early T cell development: regulation by cytokine receptors and the pre-TCR. *Semin.Immunol.* 1999;11:23-37.
  70. Ollila J, Vihinen M. B cells  
*Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2005;37:518-523.

71. He Y, Pear WS. Notch signalling in B cells. *Semin.Cell Dev.Biol.* 2003;14:135-142.
72. Hardy RR, Li YS, Allman D et al. B-cell commitment, development and selection. *Immunol.Rev.* 2000;175:23-32.
73. Rolink AG, Schaniel C, Andersson J, Melchers F. Selection events operating at various stages in B cell development. *Curr.Opin.Immunol.* 2001;13:202-207.
74. Janeway C, Travers P, Walport M, Sholmchik M. *Immunobiology* 5th edition.: Garland Publishing, New York; 2001.
75. Gounari F, Aifantis I, Martin C et al. Tracing lymphopoiesis with the aid of a pTalpha-controlled reporter gene. *Nat.Immunol.* 2002;3:489-496.
76. Martin CH, Aifantis I, Scimone ML et al. Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. *Nat.Immunol.* 2003;4:866-873.
77. Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow  
*J.Exp.Med.* 1991;173:1213-1225.

78. Li YS, Wasserman R, Hayakawa K, Hardy RR. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity*. 1996;5:527-535.
79. Li YS, Hayakawa K, Hardy RR. The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J.Exp.Med.* 1993;178:951-960.
80. Melchers F, Rolink A, Grawunder U et al. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr.Opin.Immunol.* 1995;7:214-227.
81. Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH et al. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 1994;79:143-156.
82. Bain G, Maandag EC, Izon DJ et al. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 1994;79:885-892.
83. Zhuang Y, Soriano P, Weintraub H. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 1994;79:875-884.
84. Lin H, Grosschedl R. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* 1995;376:263-267.
85. Nutt SL, Urbanek P, Rolink A, Busslinger M. Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B



lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus.  
Genes Dev. 1997;11:476-491.

86. Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. Science 1994;265:1573-1577.
87. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. J.Exp.Med. 1994;180:1955-1960.
88. Liu P, Keller JR, Ortiz M et al. Bcl11a is essential for normal lymphoid development. Nat.Immunol. 2003;4:525-532.
89. Georgopoulos K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. Nat.Rev.Immunol. 2002;2:162-174.
90. Wu L, Nichogiannopoulou A, Shortman K, Georgopoulos K. Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. Immunity. 1997;7:483-492.
91. Kirstetter P, Thomas M, Dierich A, Kastner P, Chan S. Ikaros is critical for B cell differentiation and function. Eur.J.Immunol. 2002;32:720-730.

92. Scott EW, Fisher RC, Olson MC et al. PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity*. 1997;6:437-447.
93. DeKoter RP, Walsh JC, Singh H. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *EMBO J*. 1998;17:4456-4468.
94. DeKoter RP, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 2000;288:1439-1441.
95. Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 1989;56:777-783.
96. Bain G, Robanus Maandag EC, te Riele HP et al. Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage. *Immunity*. 1997;6:145-154.
97. Hagman J, Belanger C, Travis A, Turck CW, Grosschedl R. Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes Dev*. 1993;7:760-773.
98. Hagman J, Gutch MJ, Lin H, Grosschedl R. EBF contains a novel zinc coordination motif and multiple dimerization and transcriptional activation domains. *EMBO J*. 1995;14:2907-2916.

99. Schebesta A, McManus S, Salvagiotto G et al. Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity*. 2007;27:49-63.
100. Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 1999;401:556-562.
101. Heavey B, Charalambous C, Cobaleda C, Busslinger M. Myeloid lineage switch of Pax5 mutant but not wild-type B cell progenitors by C/EBPalpha and GATA factors. *EMBO J*. 2003;22:3887-3897.
102. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat.Immunol*. 2007;8:463-470.
103. Adams B, Dorfler P, Aguzzi A et al. Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Dev*. 1992;6:1589-1607.
104. Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* 1991;65:1143-1152.
105. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE et al. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 2000;95:3489-3497.

106. Rasko JE, Metcalf D, Rossner MT, Begley CG, Nicola NA. The flt3/flk-2 ligand: receptor distribution and action on murine haemopoietic cell survival and proliferation. *Leukemia* 1995;9:2058-2066.
107. Zeigler FC, Bennett BD, Jordan CT et al. Cellular and molecular characterization of the role of the flk-2/flt-3 receptor tyrosine kinase in hematopoietic stem cells. *Blood* 1994;84:2422-2430.
108. DeKoter RP, Schweitzer BL, Kamath MB et al. Regulation of the interleukin-7 receptor alpha promoter by the Ets transcription factors PU.1 and GA-binding protein in developing B cells *J.Biol.Chem.* 2007;282:14194-14204.
109. Dias S, Silva H, Jr., Cumano A, Vieira P. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors *J.Exp.Med.* 2005;201:971-979.
110. Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu.Rev.Immunol.* 2006;24:657-679.
111. von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA et al. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J.Exp.Med.* 1995;181:1519-1526.
112. Nichogiannopoulou A, Trevisan M, Neben S, Friedrich C, Georgopoulos K. Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J.Exp.Med.* 1999;190:1201-1214.

113. DeKoter RP, Lee HJ, Singh H. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity*. 2002;16:297-309.
114. Medina KL, Pongubala JM, Reddy KL et al. Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate. *Dev.Cell* 2004;7:607-617.
115. Boelens J, Lust S, Vanhoecke B, Offner F. Chronic lymphocytic leukaemia  
*Anticancer Res*. 2009;29:605-615.
116. Kalil N, Cheson BD. Chronic lymphocytic leukemia. *Oncologist*. 1999;4:352-369.
117. Barr PM, Lazarus HM. Follicular non-Hodgkin lymphoma: long-term results of stem-cell transplantation. *Curr.Opin.Oncol*. 2008;20:502-508.
118. Meier VS, Ruffe A, Gudat F. Simultaneous evaluation of T- and B-cell clonality, t(11;14) and t(14;18), in a single reaction by a four-color multiplex polymerase chain reaction assay and automated high-resolution fragment analysis: a method for the rapid molecular diagnosis of lymphoproliferative disorders applicable to fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, blood, and bone marrow aspirates. *Am.J.Pathol*. 2001;159:2031-2043.

119. Pezzella F, Ralfkiaer E, Gatter KC, Mason DY. The 14;18 translocation in European cases of follicular lymphoma: comparison of Southern blotting and the polymerase chain reaction. *Br.J.Haematol.* 1990;76:58-64.
120. Shipley JL, Butera JN. Acute myelogenous leukemia. *Exp.Hematol.* 2009;37:649-658.
121. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation *N.Engl.J.Med.* 2006;354:1813-1826.
122. LORENZ E, UPHOFF D, REID TR, SHELTON E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J.Natl.Cancer Inst.* 1951;12:197-201.
123. MANNICK JA, LOCHTE HL, Jr., ASHLEY CA, THOMAS ED, FERREBEE JW. Autografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. *Blood* 1960;15:255-266.
124. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat.Rev.Cancer* 2004;4:371-380.
125. Bonnet D, Warren EH, Greenberg PD, Dick JE, Riddell SR. CD8(+) minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:8639-8644.

126. Cutler C, Giri S, Jeyapalan S et al. Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J.Clin.Oncol.* 2001;19:3685-3691.
127. Levesque JP, Liu F, Simmons PJ et al. Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood* 2004;104:65-72.
128. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002;100:1611-1618.
129. Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo  
*Cell* 2002;109:39-45.
130. Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C. Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;94:9836-9841.
131. Miller CL, Eaves CJ. Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;94:13648-13653.
132. Daftary GS, Taylor HS. Endocrine regulation of HOX genes

Endocr.Rev. 2006;27:331-355.

133. McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 1992;68:283-302.
134. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 1994;78:191-201.
135. Svingen T, Tonissen KF. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity* 2006;97:88-96.
136. Greer JM, Puetz J, Thomas KR, Capecchi MR. Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution. *Nature* 2000;403:661-665.
137. Scott MP. Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell* 1992;71:551-553.
138. Affolter M, Percival-Smith A, Muller M, Leupin W, Gehring WJ. DNA binding properties of the purified Antennapedia homeodomain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990;87:4093-4097.
139. Ekker SC, Young KE, von Kessler DP, Beachy PA. Optimal DNA sequence recognition by the Ultrabithorax homeodomain of *Drosophila*. *EMBO J.* 1991;10:1179-1186.
140. Levine M, Hoey T. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* 1988;55:537-540.



141. Nieuwkoop PD. Independent and dependent development in the formation of the central nervous system in amphibians; a review of experimental analysis. *Exp.Cell Res.* 1955;262-273.
142. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr.Rev.* 1999;20:358-417.
143. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993;90:11162-11166.
144. Block K, Kardana A, Igarashi P, Taylor HS. In utero diethylstilbestrol (DES) exposure alters Hox gene expression in the developing mullerian system. *FASEB J.* 2000;14:1101-1108.
145. Moens CB, Selleri L. Hox cofactors in vertebrate development *Dev.Biol.* 2006;291:193-206.
146. Mann RS. The specificity of homeotic gene function. *Bioessays* 1995;17:855-863.
147. Mann RS, Chan SK. Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet.* 1996;12:258-262.

148. Mann RS, Affolter M. Hox proteins meet more partners.  
Curr.Opin.Genet.Dev. 1998;8:423-429.
149. Chang CP, Shen WF, Rozenfeld S et al. Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. Genes Dev. 1995;9:663-674.
150. Phelan ML, Rambaldi I, Featherstone MS. Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. Mol.Cell Biol. 1995;15:3989-3997.
151. Shen WF, Montgomery JC, Rozenfeld S et al. AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. Mol.Cell Biol. 1997;17:6448-6458.
152. Magli MC, Barba P, Celetti A et al. Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1991;88:6348-6352.
153. Magli MC, Largman C, Lawrence HJ. Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. J.Cell Physiol 1997;173:168-177.
154. Celetti A, Barba P, Cillo C et al. Characteristic patterns of HOX gene expression in different types of human leukemia. Int.J.Cancer 1993;53:237-244.

155. Brady G, Barbara M, Iscove NN. Representative in Vitro cDNA Amplification From Individual Hemopoietic Cells and Colonies. *Methods Mol. Cell Biol.* 1990;17-25.
156. McGonigle GJ, Lappin TR, Thompson A. Grappling with the HOX network in hematopoiesis and leukemia *Front Biosci.* 2008;13:4297-4308.
157. Lonai P, Arman E, Czosnek H, Ruddle FH, Blatt C. New murine homeoboxes: structure, chromosomal assignment, and differential expression in adult erythropoiesis. *DNA* 1987;6:409-418.
158. Kongsuwan K, Webb E, Housiaux P, Adams JM. Expression of multiple homeobox genes within diverse mammalian haemopoietic lineages. *EMBO J.* 1988;7:2131-2138.
159. Shen WF, Largman C, Lowney P, Hack FM, Lawrence HJ. Expression of homeobox genes in human erythroleukemia cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1989;271:211-219.
160. Lowney P, Corral J, Detmer K et al. A human Hox 1 homeobox gene exhibits myeloid-specific expression of alternative transcripts in human hematopoietic cells. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:3443-3449.
161. Mathews CH, Detmer K, Boncinelli E, Lawrence HJ, Largman C. Erythroid-restricted expression of homeobox genes of the human HOX 2 locus. *Blood* 1991;78:2248-2252.

162. Vieille-Grosjean I, Roullot V, Courtois G. Identification of homeobox-containing genes expressed in hematopoietic blast cells.  
Biochem.Biophys.Res.Communic. 1992;185:785-792.
163. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK. Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size  
Blood 1999;94:2605-2612.
164. Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1994;91:12223-12227.
165. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. Genes Dev. 1995;9:1753-1765.
166. Krosl J, Austin P, Beslu N et al. In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein  
Nat Med. 2003;9:1428-1432.
167. Hetu F, Coutlee F, Roy DC. A non-isotopic nested polymerase chain reaction method to quantitate minimal residual disease in patients with non-Hodgkin's lymphoma. Mol.Cell Probes 1994;8:449-457.
168. Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular

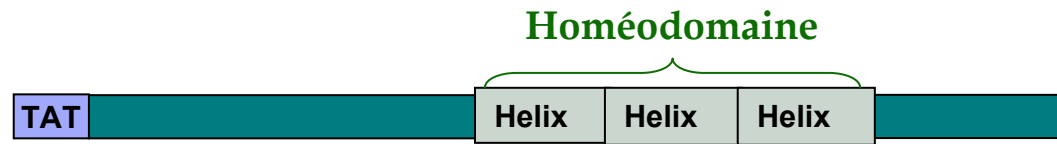
- stomatitis virus G pseudotypes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:11400-11406.
169. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993;90:8033-8037.
  170. Bijl J, Sauvageau M, Thompson A, Sauvageau G. High incidence of proviral integrations in the Hoxa locus in a new model of E2a-PBX1-induced B-cell leukemia. *Genes Dev.* 2005;19:224-233.
  171. Kamps MP, Baltimore D. E2A-Pbx1, the t(1;19) translocation protein of human pre-B-cell acute lymphocytic leukemia, causes acute myeloid leukemia in mice. *Mol.Cell Biol.* 1993;13:351-357.
  172. Thorsteinsdottir U, Kros J, Kroon E et al. The oncoprotein E2A-Pbx1a collaborates with Hoxa9 to acutely transform primary bone marrow cells. *Mol.Cell Biol.* 1999;19:6355-6366.
  173. Dederer DA, Waller EK, LeBrun DP et al. Chimeric homeobox gene E2A-PBX1 induces proliferation, apoptosis, and malignant lymphomas in transgenic mice. *Cell* 1993;74:833-843.
  174. Collins LS, Dorshkind K. A stromal cell line from myeloid long-term bone marrow cultures can support myelopoiesis and B lymphopoiesis. *J.Immunol.* 1987;138:1082-1087.

175. Kondo M, Scherer DC, Miyamoto T et al. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* 2000;407:383-386.
176. Macintyre EA, Belanger C, Debert C et al. Detection of clonal CD34+19+ progenitors in bone marrow of BCL2-IgH-positive follicular lymphoma patients. *Blood* 1995;86:4691-4698.

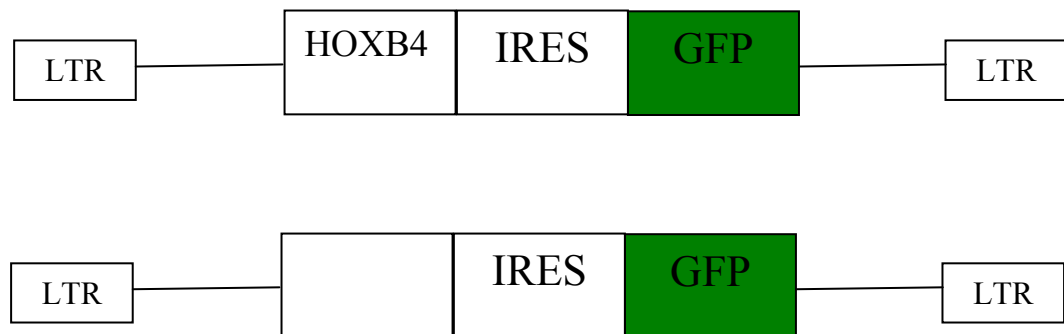
## **Annexe**

### Annexe 1 Constructions utilisées

#### Construction de TAT-HOXB4



#### Constructions des vecteurs GFP et HOXB4-GFP



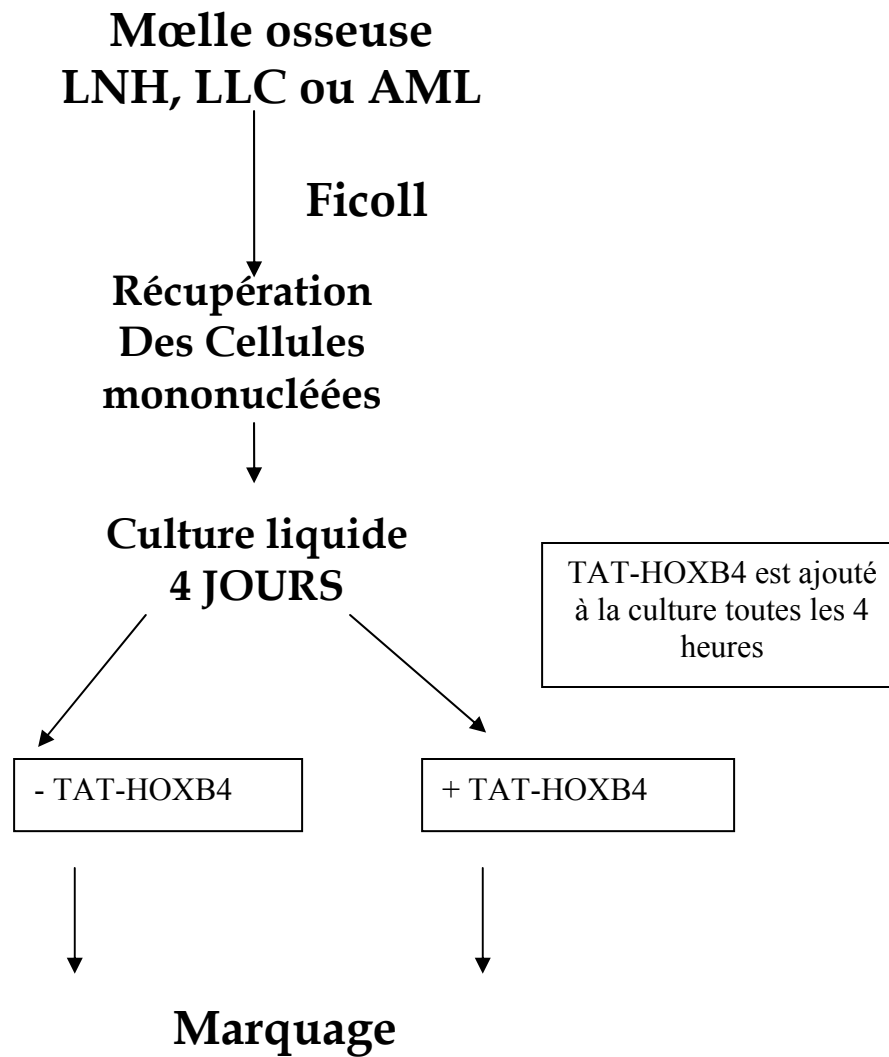
#### Construction du vecteur E2A-PBX1





**Annexe 2 Schémas des différentes expériences**

Schéma de l'expérience des figures 1 2 et 4



## Schéma de l'expérience des figures 6 et 7

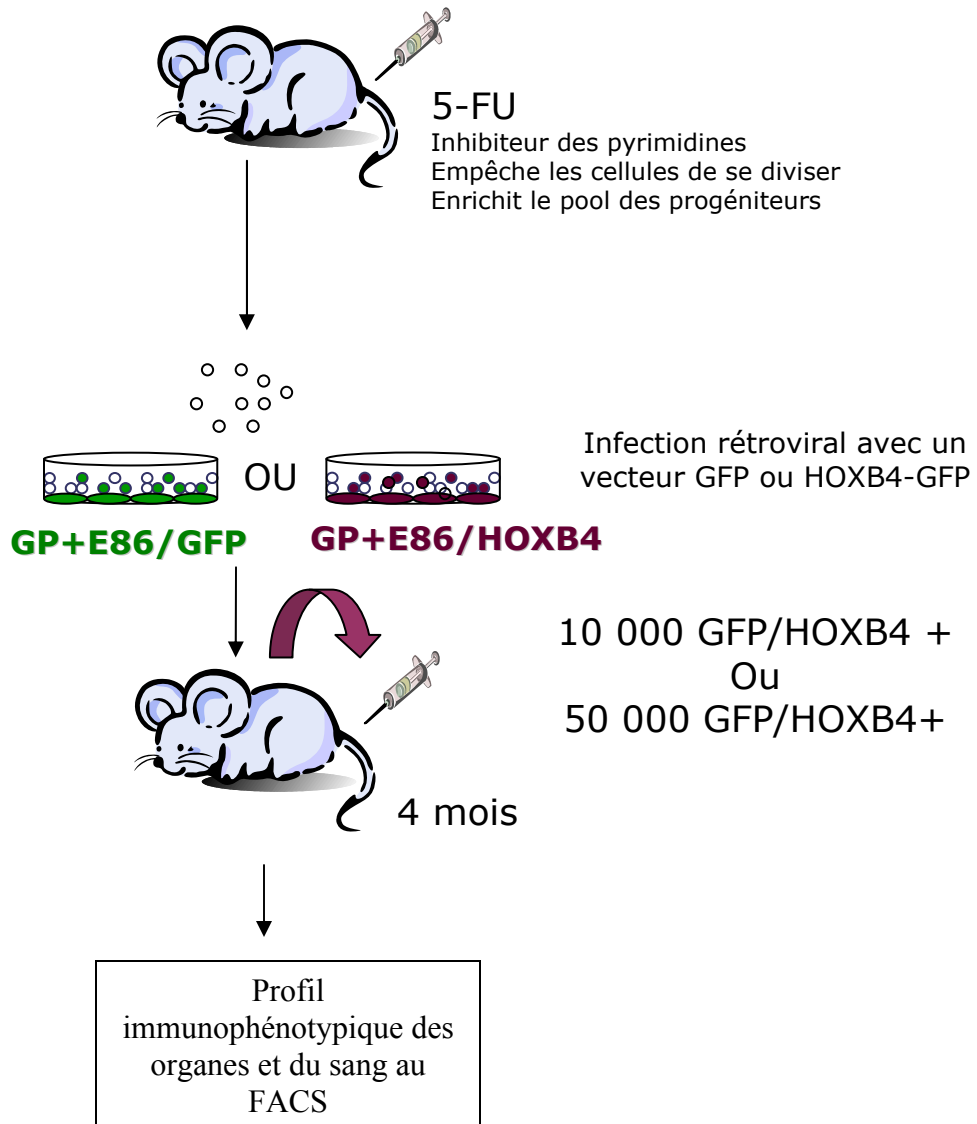


Schéma de l'expérience du la figure 10

